

THESE
Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
Spécialité : BIOLOGIE

**Résistance Métabolique des Larves de Moustiques aux Insecticides :
Conséquences Environnementales**

Thèse soutenue publiquement le 29 septembre 2006

Par

Sébastien Boyer

Composition du Jury

- M. Couderchet (Pr)	Rapporteur
- P. Sabatier (Pr)	Rapporteur
- C. Dauphin-Villemant (CR)	Directeur de thèse
- P. Ravanel (Pr)	Directeur de thèse
- G. Lempérière (PAST)	Examineur

Thèse préparée du Laboratoire d'Ecologie Alpine (UMR UJF-CNRS 5553) en partenariat avec l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication Ain, Isère, Rhône, Savoie

Sommaire

<u>Chapitre 1 : Introduction</u>	4
<i>A – Le moustique</i>	5
I. Position systématique	5
II. Cycle biologique	5
III. Intérêts dans l'écosystème	6
IV. Nuisances et problèmes de santé	7
V. Populations invasives	7
VI. Moyens de contrôles	8
<i>B – La lutte chimique</i>	9
I. L'histoire du DDT	9
II. Evolution de l'arsenal chimique : vers un mieux environnemental	10
III. Les dérives environnementales	11
<i>C – La deuxième époque de lutte</i>	12
I. La lutte intégrée	12
II. Organisme français de la lutte intégrée contre les moustiques	13
III. La lutte biologique	14
<i>D – Problématique</i>	15
I. Questions du gestionnaire	15
II. Objectifs de thèse	15
 <u>Chapitre 2 : Méthodes utilisées</u>	 17
<i>A - Modèle biologique</i>	17
I. <i>Aedes aegypti</i>	17
II. Sélection d'une souche d' <i>A. aegypti</i> tolérant à la litière toxique	18
III. <i>Ochlerotatus cataphylla</i>	18
IV. <i>Aedes rusticus</i>	19
<i>B - Réalisation des bioessais</i>	19
I. Evaluation de la mortalité	19
II. La pré-exposition	20
<i>C - Dosages biochimiques des activités enzymatiques de détoxification</i>	21
I. Mesures des activités monooxygénases à cytochrome P450	22
II. Préparation des extraits enzymatiques	22
III. Mesures des activités glutathion-S-transférases	23
IV. Mesure des activités estérases	23

D - Quantification de l'expression de gènes CYP	24
I. Pré-exposition à la litière toxique	24
II. Caractérisation de gènes codant pour des monooxygénases à cytochrome P450 chez <i>A. aegypti</i>	24
III. Expression de l'étude des gènes CYP	25
IV. Analyse des images et analyses statistiques	26
E – Méthodes statistiques	26
 <u>Chapitre 3 : Analyse des mécanismes de résistance métabolique</u>	 28
A - Induction et Sélection	28
I. Effets d'une pré-exposition et d'une sélection sur la mortalité liée à cette même litière toxique	28
II. Conséquences de la pré-exposition et de la sélection avec la litière toxique sur les activités enzymatiques de détoxification	30
 B - Induction de gènes CYP par la litière toxique	32
I. Isolation des gènes CYP des larves d' <i>A. aegypti</i>	32
II. Expression différentielle des gènes après pré-exposition des larves à la litière toxique	34
III. Expression différentielle des gènes aux différents stades de vie et dans différents organes	34
IV. Analyse de la séquence génomique du gène <i>CYP6AL1</i>	36
 C- Plasticité fonctionnelle et Résistances multiples	38
 D- Conclusion	42
 <u>Chapitre 4 : Impact des facteurs environnementaux sur la tolérance aux insecticides</u>	 43
A- Mise en évidence d'une sensibilité différente à 2 insecticides sur des populations sauvages d'<i>Ochlerotatus cataphylla</i>.	43
I. Différences de sensibilité au téméphos et au <i>Bti</i>	44
II. Relations entre niveaux d'activités enzymatiques de détoxification et sensibilité des larves sauvages au téméphos et au <i>Bti</i>	46
 B- Un traitement répété au <i>Bti</i> peut-il créer des conditions d'émergence de lignées résistantes à cette toxine ?	49
I. Echantillonnage	49
II. Effet d'un historique de traitement <i>Bti</i> sur le terrain sur la tolérance au <i>Bti</i>	50
III. Conclusion	51

C- <i>Pré-exposition avec d'autres xénobiotiques</i>	52
I. L'atrazine est-elle capable d'influencer la sensibilité larvaire au Bti et au téméphos ?	52
II. Effet d'une pré-exposition avec des xénobiotiques divers sur la mortalité larvaire au <i>Bti</i>	55
III. Conclusion	56
 <u>Chapitre 5 : Discussion</u>	 58
 A- <i>Les xénobiotiques dans les gîtes à moustiques</i>	 58
I. Contexte environnemental	58
II. Xénobiotiques et évolution de la résistance	58
III. Hypothèses sur la résistance	59
IV. Complexité des mécanismes impliqués	60
 B- <i>Impact des xénobiotiques sur la tolérance larvaire aux insecticides</i>	 60
I. Xénobiotiques naturels : exemple d'une litière toxique	60
II. Xénobiotiques d'origine anthropique	61
III. Comment expliquer les mécanismes d'une augmentation de la tolérance au <i>Bti</i> ?	62
 C- <i>Réflexions sur la complexité du terrain et la simplification expérimentale en laboratoire</i>	 63
 <u>Chapitre 6 : Conclusion</u>	 64
 <u>Chapitre 7 : Bibliographie</u>	 65

Chapitre 1 : Introduction

Durant le XXème siècle, une des principales caractéristiques des paysages ruraux a été un profond changement d'usages auxquels ils ont été soumis de la part de l'homme. Ces changements ont été dans un premier temps le fait des pays développés. En Europe, à la suite du deuxième conflit mondial et avec l'appui du Plan Marshall, une agriculture nouvelle dite intensive s'est rapidement mise en place : mécanisation, remembrement, sélection de variétés plus productives, fertilisants, irrigation, pesticides, mondialisation des échanges commerciaux... Les **conséquences sur la société et l'environnement** de telles pratiques n'ont pas été mesurées de prime abord mais n'ont pas tardé à se manifester : excédents de certaines récoltes, chute des cours, amplification des déséquilibres Nord-Sud, invasivité de certains ravageurs associés à de grandes zones de monoculture, perte de biodiversité, pollution des eaux, des sols, de l'atmosphère, résidus dans les récoltes...

Dans le même temps, de vastes zones peu rentables dans le nouveau contexte économique ont été (et sont encore) abandonnées à leur évolution naturelle (zones de montagne en déprise agricole, jachères, zones humides peu propices à l'agriculture). Sans contraintes anthropiques, ces zones ont évolué librement laissant s'installer des espèces à fort potentiel colonisateur. Certaines de ces espèces ne sont pas sans poser aujourd'hui des problèmes de santé publique ou de nuisances socio-économiques. C'est en particulier le cas des **moustiques** qui représentent le matériel utilisé et étudié dans ce travail. L'emploi dès les années 40 d'insecticides de synthèse pour tenter de contrôler ces diptères n'a pas été sans conséquence sur les évolutions des écosystèmes traités. En particulier, l'apparition de lignées résistantes à telle ou telle molécule ne s'est pas fait attendre très longtemps.

En considérant l'utilisation massive d'insecticides et les problèmes socio-économiques liés à la présence de moustiques, nous avons focalisé ce travail sur les possibilités et les mécanismes d'apparition de **résistances aux traitements bio-insecticides**. Nous avons en particulier étudié l'impact de traitements (insecticides et non-insecticides) sur les mécanismes de résistance métabolique. Notre travail s'axe à la fois sur des expérimentations de laboratoire et sur des expériences effectuées en conditions semi-contrôlées sur le terrain.

Moustiques, insecticides et résistance seront trois des mots clefs qui seront souvent retrouvés dans ce mémoire.

A- Le moustique

I. Position systématique

Les **moustiques** appartiennent à la classe des Insectes, à l'ordre des Diptères, et à la famille des Culicidae (Tableau 1). Les moustiques sont trouvés **partout autour du globe**, excepté dans les zones gelées en permanence. Nous référençons aujourd'hui plus de 3500 espèces (Marquardt *et al.* 2005), dont trois-quarts environ sont originaires des zones subtropicales et tropicales humides. Une liste taxonomique (Schaffner 1999) présente 63 espèces de la famille des Culicidae présents en France métropolitaine, Corse comprise, ainsi répartie : 27 espèces issues du genre *Aedes* (Meigen, 1818), 13 espèces du genre *Anopheles* (Meigen, 1818), 10 espèces du genre *Culex* (Linnaeus, 1758), 8 espèces du genre *Culiseta* (Felt, 1904), 2 espèces du genre *Coquillettidia* (Dyar, 1905), 1 espèce du genre *Orthopodomyia* (Theobald, 1904), et 1 espèce du genre *Uranotaenia* (Lynch Arribalzaga, 1891). Aujourd'hui, le genre *Aedes* a été scindé en 2, les genres *Aedes* et *Ochlerotatus*, seulement distingués par des techniques de biologie moléculaire.

Tableau 1. Position systématique du moustique

Règne	Animal
Phylum	Arthropode
Sous-phylum	Hexapode
Classe	Insecte
Sous-classe	Ptérygote
Infra-classe	Néoptère
Ordre	Diptère
Sous-ordre	Nématocères
Infra-ordre	Culicomorphes
Famille	Culicidés

Ils se sont adaptés à tous les habitats. On trouve des espèces présentes dans les forêts, dans les prairies et dans les habitations, enfin d'autres se sont adaptés à la vie exclusivement citadine. Même si on connaît en France beaucoup d'espèces univoltines (1 seule génération par an), beaucoup d'autres notamment dans les pays chauds, ont plusieurs générations par an. On peut, au sein d'un même genre, trouver des **adaptations locales** pour éviter la compétition entre espèces. Par exemple, on trouve dans une même étendue d'eau, des larves qui émergeront en mars après avoir passé l'hiver sous la glace, d'autres en mars-avril, et une dernière espèce pendant l'été. Il peut exister ainsi une répartition temporelle des espèces dans un même biotope.

Tous ces exemples montrent une biodiversité complexe parmi les espèces de moustiques. Enfin, ces insectes représentent un **enjeu sanitaire et socio-économique** non négligeable dans l'environnement humain.

II. Cycle biologique

La vie du moustique est composée de **3 stades distincts** : les stades larvaire, nymphal (tous deux aquatiques) et le stade adulte (aérien) (Figure 1). Le stade larvaire est composé de

4 étapes différentes (nommées simplement stade 1, 2, 3 et 4), séparés par 4 mues. La durée du stade larvaire est température/ressources alimentaires/environnement dépendante. Le stade nymphal, après une mue de la larve de stade 4, se caractérise par le fait que l'organisme ne se nourrit pas. Enfin, l'éclosion de la nymphe conduit à l'imago (= adulte).

La biologie de ce dernier est particulière dans le sens où, la femelle, pour amener ses œufs à maturité, a un besoin vital de sang. En effet, ce **repas de sang** apporte la chaleur et les protéines nécessaires au développement des œufs.

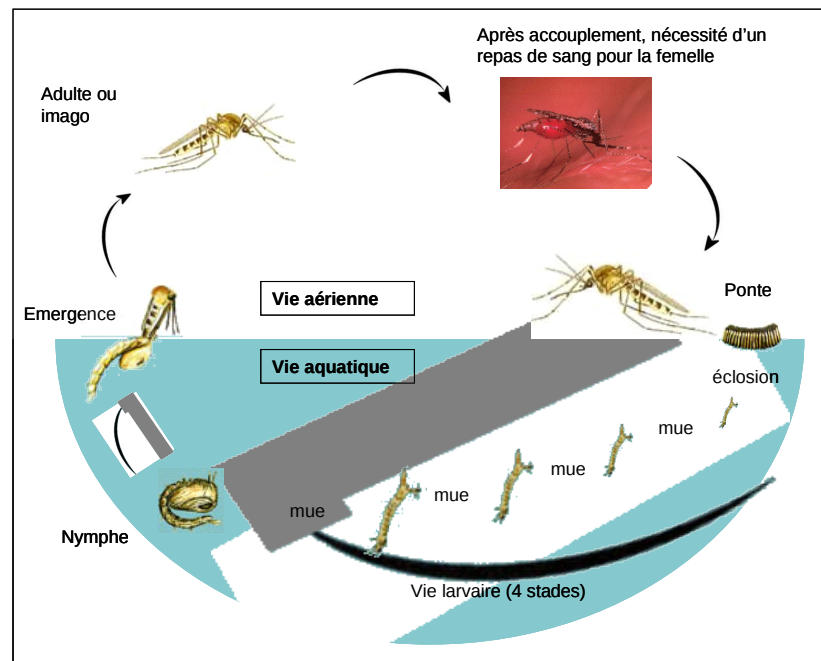


Figure 1. Cycle de vie simplifié du moustique

III. Intérêts dans l'écosystème

Le moustique représente un **maillon essentiel dans le fonctionnement d'un écosystème** aquatique. En effet, par sa présence en grand nombre, il représente une biomasse importante dont se nourrissent de nombreux organismes (batraciens, poissons...). Ils sont ainsi un maillon important de la chaîne trophique des zones humides. De plus, de part leur régime alimentaire, les larves participent au processus de destruction de la matière organique. Leur régime omnivore, avec l'ingestion de feuilles en décomposition par exemple, accélère la décomposition des matières organiques dans les écosystèmes aquatiques.

Enfin, au stade adulte, il est indéniable que le rôle de vecteur du moustique est prépondérant dans notre environnement. En effet, il est à lui seul responsable de la **transmission** de plus de 100 types de **microorganismes**. Aujourd'hui, nous ne connaissons pas d'effets *a priori* positifs dans la transmission de ces microorganismes. Par contre, nous percevons plus facilement son rôle néfaste dans la transmission de maladies ; l'épidémie virale du Chikungunya (CHIKV de la famille des Togaviridae) en 2005-2006 à La Réunion en est un exemple concret avec plus de 200 000 personnes touchées et plus de 100 décès.

IV. Nuisances et problèmes de santé

Dans quasiment toutes les espèces de moustiques, les femelles obtiennent les protéines nécessaires pour le développement des œufs par nourriture de sang de vertébrés. D'un point de vue sanitaire, la piqure de l'homme par les adultes femelles de nombreux culicidés anthropophiles, nécessaire à la maturation des pontes, ne se résume pas seulement au désagrément passager lié à la prise de sang (Failloux et Rodhain 1999). Cette prise directe du fluide dans les capillaires sanguins va permettre à différentes formes de vies (virus, protozoaires, vers nématodes) d'exploiter les moustiques comme voie de transferts vers les hôtes vertébrés. **Beaucoup d'agents pathogènes** tels que des virus (ex. l'amaril responsable de la fièvre jaune) ou des protozoaires (ex : *Plasmodium falciparum* responsable du paludisme) utilisent le moustique comme vecteur puis l'homme comme hôte pour la réalisation de leur cycle biologique infectant ainsi à l'homme de nombreuses maladies.

Le moustique est responsable de **2 à 2,5 millions de décès humains par an**. Parmi les maladies les plus tristement célèbres, le paludisme (250 millions de personnes infectées par an) tue à lui seul près de 2 millions de personnes par an, dont la majorité est des enfants, essentiellement dans les pays tropicaux d'Afrique et d'Asie (Figure 2). La dengue (plus de 30 000 décès/an) et la fièvre jaune (plus de 30 000 décès/an dont 95% en Afrique) sont les autres maladies frappant un grand nombre de personnes.

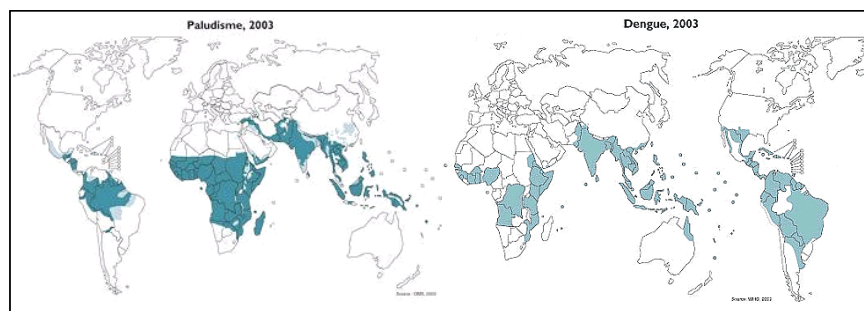


Figure 2. Cartes de distribution du paludisme (à gauche) et de la dengue (à droite) en 2003

Il n'existe, aujourd'hui, **aucun traitement** spécifique mais uniquement des vaccins préventifs pour combattre certaines de ces maladies. Une lutte, chimique et/ou biologique, peut permettre le contrôle des populations de moustiques vecteurs dans les zones concernées.

V. Populations invasives

Le qualificatif d'**espèce invasive** est associé à une espèce qui se trouve à l'extérieur de son aire de répartition ou de son aire de dispersion potentielle (Pascal et Chapuis 2000). La notion d'espèce invasive est une notion récente. Pour la comprendre, il faut savoir que les équilibres entre espèces au sein des écosystèmes, à l'échelle de temps humaine au moins, sont relativement bien établis. En l'absence d'intervention humaine, les phénomènes de multiplication d'une espèce invasive sont extrêmement rares.

Toutes les espèces introduites ne deviennent pas des espèces invasives. On estime qu'environ une espèce introduite sur mille devient invasive. La notion d'espèce invasive est très anthropique, lorsqu'une espèce introduite présente un impact écologique, économique ou social sérieux on dit qu'elle est invasive. Pour précision, il existe des distinctions dans la **perception des invasions**, avec l'existence même de termes consacrées aux invasions désirées (notamment pour les cultures), et des invasions subies (c'est le cas de toutes les invasions qui nous apparaissent nuisibles).

Dans un contexte où les déplacements humains à grandes distances sont toujours plus nombreux, l'impact sur le climat des activités humaines toujours plus fort, le **risque d'une augmentation** des transports d'espèces invasives (avec ses conséquences sur la biodiversité) est bien réel. L'un des exemples les plus récents, pour n'en citer qu'un, est l'installation de la chrysomèle américaine des racines du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera*) en Europe (Hummel 2003). Pour lutter contre toute espèce définie comme invasive, il apparaît nécessaire de se pencher sur la biologie de ces organismes et de comprendre les facteurs favorables à cette invasivité.

Ainsi, l'augmentation de l'invasivité (par exemple *Aedes albopictus* aux Etats-Unis et dans la zone méditerranéenne de l'Europe), qui serait due en partie au réchauffement climatique et à l'augmentation des résistances aux insecticides, font de la lutte anti-moustiques une thématique majeure très complexe. Les interactions complexes entre tous les facteurs climatiques déterminent l'**effet du climat** sur les prévalences des maladies transmissibles par le moustique (Gilles et Warrell 1993; Cook 1996). Il a été suggéré que l'incidence du paludisme sous les tropiques pourrait augmenter de 60% suite au réchauffement climatique (McMichael *et al.* 1996; Watson *et al.* 1996; Martens *et al.* 1999), sachant qu'il a déjà été déclaré que les recrudescences récentes sont aussi provoquées par le réchauffement qui a déjà eu lieu (Watson *et al.* 1996; Epstein *et al.* 1998; Loevinsohn 1994).

L'histoires des 3 grandes maladies que sont le paludisme, la fièvre jaune et la dengue révèle que le climat a rarement été la composante principale de leur prévalence, **les activités humaines** et leur impact sur l'écologie locale ayant un impact plus significatif (Reiter 2001). En effet, dans beaucoup de pays, le développement rapide, l'augmentation des populations, les guerres civiles, les pratiques humaines (l'arrêt de l'utilisation dans certaines régions du DDT en Afrique du Sud par exemple) semblent bien plus fortement corrélés aux diverses réémergences récentes (Reiter 2001).

Même si les facteurs ne sont pas encore totalement connus (changements climatiques pour les uns (Guillet 2001), mondialisation des échanges économiques et humains pour les autres (Gratz 1999; Lounibos et Conn 2000), les maladies comme le paludisme, les filarioses, les encéphalites, la dengue et les fièvres hémorragiques apparaissent aujourd'hui en recrudescence. Aussi, le **contrôle de ces populations vectrices** s'avère d'autant plus difficile car celles-ci sont en voie d'expansion.

VI. Moyens de contrôle

Les premiers moyens de lutte furent l'**élimination de certaines zones humides** permanentes ou temporaires (étangs, marais, marécages, étangs d'eau printanière). C'est le développement de l'élimination de ces zones d'eau, et donc de l'habitat naturel du moustique,

qui a permis de diminuer les populations de moustiques et d'éradiquer certaines maladies. Par exemple, en Rhône-Alpes, un programme d'assainissement dans les Dombes a fait chuter le nombre de « fiévreux » de 55% entre 1957 et 1977 (Pautou *et al.* 1995). Cette idée, séduisante au départ, a entraîné des problèmes au niveau de la gestion des zones humides, notamment une perte d'« habitats remarquables ». Une prise de conscience de la valeur patrimoniale de tels habitats a eu comme conséquence le développement de stratégies nouvelles de lutte contre les moustiques. C'est ainsi que les premières luttes insecticides ont commencé avec la lutte chimique.

B- La lutte chimique

I. L'histoire du DDT (Regnault-Roger 2005)

Les **insecticides chimiques** utilisés à l'encontre à la fois des adultes et des larves de moustiques ont connu une forte utilisation dans la deuxième moitié du siècle dernier, suite à la seconde guerre mondiale. D'ailleurs, le 1^{er} insecticide de synthèse fut utilisé durant cette guerre pour débarrasser les soldats du typhus. Bien que préparé dès 1874 par Zeidler (Budavari *et al.* 1989), cet organochloré fût décrit par Müller pour son efficacité insecticide reconnue en 1939 seulement et lui valu le **Prix Nobel** de Physiologie Médicale en 1948. Cet insecticide est le DichloroDiphénylTichloroéthane familièrement connu sous l'appellation DDT (Figure 3). Il s'agit d'un insecticide de la famille des organochlorés agissant au niveau des cellules nerveuses. Il s'accumule dans les membranes cellulaires et perturbe les équilibres cationiques K^+/Na^+ conduisant à des convulsions et des paralysies, puis à la mort.

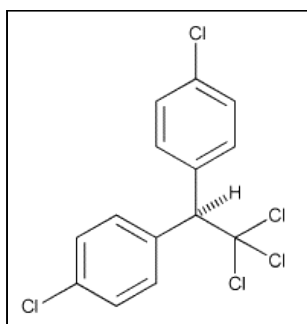


Figure 3. Formule chimique du DDT

Mais ensuite vinrent des études plus poussées sur ses propriétés et son rôle au sein de l'écosystème. Il possède une solubilité dans l'eau quasiment nulle (3 g/L) et une solubilité forte dans les lipides. Il possède de fortes **propriétés de bioaccumulation** et de biomagnification. C'est ainsi que, dans les années 60, on observe des dysfonctionnements d'écosystèmes aquatiques et terrestres parfois situés très loin des zones traitées. L'exemple le plus frappant est l'atteinte de l'enzyme qui conditionne le dépôt de Ca^{++} sur les coquilles des œufs chez les manchots polaires. Cet exemple démontre à lui seul le fort pouvoir de circulation planétaire de cet insecticide. De plus des populations d'insectes sont devenues résistantes au DDT.

Cet insecticide, autrefois encensé, fait partie aujourd'hui d'une liste d'insecticides classés par le *Pesticide Action Network* parmi « les douze salopards » (liste aujourd'hui de 18

insecticides). En 2000, 122 nations signent un protocole de **non production** et de **non utilisation** du DDT. Cet insecticide reste encore utilisé avec succès contre la malaria en Inde, en Chine, en Afrique, en Malaisie et au Mexique. L'utilisation de cet insecticide démontre toute la complexité des déséquilibres sociaux-économiques et sanitaires. En effet, le coût de production très faible du DDT et son efficacité forte restent « un avantage certain » pour son utilisation dans les pays en développement.

II. Evolution de l'arsenal chimique : vers un mieux environnemental

Depuis la mise en évidence de dysfonctionnements liés à l'emploi des insecticides, l'ensemble des acteurs impliqués dans l'utilisation des pesticides travaille pour diminuer les risques environnementaux. **L'évolution de la lutte chimique** a suivi ce processus, par la concentration des matières actives maîtrisée, et par la diversité des insecticides utilisés avec un temps de rémanence dans le milieu de plus en plus court. Sont alors apparus des insecticides agissant par ingestion, par contact, entraînant des dérèglements des mues, des dérèglements comportementaux avec confusion sexuelle, agissant sur le système nerveux, sur l'appareil digestif....

On classe les insecticides chimiques en **trois catégories**. La première génération d'insecticides de synthèse date d'avant 1940 (ex : dinitro-o-crésylate de potassium, dinitro-orthocrésol) et côtoyaient des insecticides inorganiques (acéto-arséniate de cuivre), fluorés (fluore de sodium), soufrés (sulfure de carbone). La deuxième génération correspond aux insecticides organiques de synthèse divisés en organochlorés (DDT, lindane, endosulfan), organophosphorés (dichlorvos, chlorpyrifos, téméphos) et carbamates (carbaryl, aldicarbe, propoxur). La troisième génération d'insecticides, apparue plus tard, comprend les pyréthrinoides de synthèse, les phénylpyrazoles (fipronil), les néonicotinoïdes (imidaclopride) et aussi les régulateurs de croissance d'insectes (RCI : fénoxycarbe, lufénuron) (Regnault-Roger 2005). Les organochlorés (6%), organophosphorés (43%), carbamates (32%) et pyréthroïdes (6%) représentent la majorité des insecticides organiques utilisés actuellement (Comité de prévention et de la précaution, Ministère de l'Environnement et du Développement Durable, 2002).

Plus spécifiquement, en Rhône-Alpes, pendant deux décennies (1970-1989), l'E.I.D. a utilisé des larvicides chimiques : les organo-phosphorés. Le fénitrothion, rapidement abandonné, puis le téméphos (formulation Abate, Bayer) furent utilisés : ce sont les insecticides qui donnaient le maximum de régulation, bien qu'aux doses opérationnelles de terrain, il n'était pas le larvicide idéal car son spectre d'action restait large. **Le téméphos** est un insecticide appartenant à la famille des organophosphorés (O,O'-[thiodi-4,1-phenylene]bis[O,O-diméthyl phosphoro thioate]) et est encore largement utilisé dans la lutte contre les moustiques. C'est un neurotoxique qui bloque l'acétylcholinestérase. Il est très efficace, notamment sur les insectes (Ishaaya 2001).

Ces insecticides chimiques, très utilisés et très efficaces, ont entraîné des **dysfonctionnements environnementaux**, dont l'un est le développement de résistance des populations traitées. Au début des années soixante, le message de **Rachel Carson** (Carson 1962) a fait prendre conscience des effets pervers des pesticides de synthèse et a obligé les gouvernements à se préoccuper des problèmes environnementaux et de santé associés à l'utilisation des pesticides. Depuis, on essaie à chaque instant d'améliorer la lutte insecticide avec des nouveaux produits ou de nouvelles formulations afin de trouver des solutions adaptées dans le cadre d'une gestion durable.

III. Les dérives environnementales

A partir du moment où un traitement chimique contre les nuisibles est entamé, il apparaît difficile de revenir rapidement en arrière. Explicitement, **l'insecte** avec son turn-over important de générations (1 voire 3 ou 4 par an pour le moustique) **s'adapte** très vite à ses nouvelles conditions environnementales, comme la présence de molécules insecticides. Aussi, en matière de lutte contre les insectes ravageurs et vulnérants, il apparaît impossible de baisser la garde.

Cet emploi systématique d'insecticides pour lutter contre les larves de moustiques a conduit et conduit encore à l'apparition de **phénomènes de résistance** réduisant considérablement l'efficacité des traitements (Brogdon et McAllister 1998). Entre 1948 et 1990, le nombre de cas de résistance chez les insectes est en constante progression : 14 espèces en 1948, 224 en 1969 et plus de 500 en 1990 (Mouches *et al.* 1990). Chez différentes espèces de moustiques, dont *Culex pipiens*, ces résistances ont déjà été démontrées pour des insecticides conventionnels (Raymond *et al.* 1986; Raymond *et al.* 1998). La résistance est d'ailleurs étudiée à plusieurs niveaux biologiques, utilisant des techniques moléculaires, génétiques, cellulaires, métaboliques et écologiques entre autres (Scott 1989; Liu et Scott 1997).

Il aura fallu moins d'un demi-siècle pour que les insectes fassent une démonstration darwinienne de leur capacité à résister à la pression des pesticides. La résistance acquise est le fruit de l'hétérogénéité génétique des populations. Au sein d'une espèce, une ou plusieurs mutations génétiques, survenues au hasard, confèrent à certains individus une capacité à survivre à des conditions environnementales nouvelles (Raymond et Mouches 1986; Roush et McKenzie 1987; Georghiou 1990; McKenzie et Batterham 1994). Cette résistance est supposée évoluer plus rapidement si la variabilité génétique initiale des populations exposées est importante, si le taux de reproduction et le renouvellement des générations sont élevés, si la proportion initiale de la population exposée et tuée est élevée et si le taux d'immigration depuis d'autres populations non exposées est faible. Ces populations, avec **des processus de résistance** ainsi sélectionnés, possèdent alors un **potentiel énorme de colonisation** de niches écologiques laissées libres par les populations éradiquées

Classiquement, on décrit les transformations biochimiques par les enzymes de détoxification d'un composé toxique en trois étapes successives ou trois phases. **La phase I** consiste en une transformation structurale conférant à la molécule une augmentation d'hydrophilie. L'exemple type est l'hydroxylation (fixation d'un -OH) d'un noyau aromatique. **La phase II** consiste à transformer les produits de la phase I en dérivés plus hydrophiles par adjonction de sucres, acides aminés ou petits peptides type glutathion. Les produits ainsi hydrophiles peuvent circuler plus librement en phase aqueuse. **La phase III** correspond à l'élimination des produits par excrétion en phase aqueuse avec l'évacuation des produits de dégradation des compartiments cellulaires (Yu 1984; Kreuz *et al.* 1996; Oliveira *et al.* 1999).

Les avancées des études de ces modes d'action métaboliques depuis les 25 dernières années ont multiplié nos connaissances sur les effets inductifs impliquant des enzymes de

détoxication. L'importance des changements métaboliques due à des **inductions par insecticide** est étudiée régulièrement et assidûment depuis 1979 (Brattsten 1979). Des travaux préliminaires sur les effets inductifs sur des activités enzymatiques, comme celle des monooxygénases à cytochrome P450 (cyt P450) chez une mouche (*Musca domestica* ; Yu et Terriere 1979), des glutathion-S-transférases (GST) chez un papillon (*Spodoptera frugiperda* ; Yu 1982), puis d'autres études avec notamment le cas des estérases chez les insectes ont suivi (Dowd *et al.* 1983 ; Yu 1986). D'autres travaux suggèrent une possible relation entre l'induction d'activités enzymatiques et l'augmentation de résistance chez les insectes (Lee et Scott 1989; Ranasinghe et Hobbs 1999; Suwanchaichinda et Brattsten 2001) avec l'hypothèse que la résistance aux insecticides peut être influencée par des types de produits chimiques autres que des insecticides (Snyder *et al.* 1993; Hemingway *et al.* 2004; Suwanchaichinda et Brattsten 2002).

La protection des écosystèmes implique le développement de pesticides non rémanents, sélectifs pour les espèces à contrôler et sans effets sur les autres organismes des écosystèmes concernés.

C- La deuxième époque de lutte

I. La lutte intégrée

En moins d'un siècle de lutte insecticide, nous sommes passés d'une lutte chimique largement empirique à une lutte chimique conseillée puis à une lutte dirigée, cette dernière introduisant les notions de seuil de tolérance, d'utilisation de pesticides à faible répercussion environnementale et de sauvegarde des organismes auxiliaires existants. Aujourd'hui, nous utiliserions plutôt le terme de **lutte intégrée** qui tente de respecter les points précédemment cités en intégrant l'utilisation de moyens biologiques de lutte et la limitation maximale de la lutte chimique (OILB 1977). Autrement dit, la lutte intégrée correspond à une gestion des populations de ravageurs qui met en œuvre les techniques appropriées d'une manière aussi compatible que possible avec le respect de l'environnement pour maintenir ces populations invasives ou nuisances à des niveaux inférieurs au seuil de nuisance acceptable pour les activités anthropiques.

Dans la lutte contre les moustiques, l'une des premières mesures fût de **restaurer le fonctionnement des zones humides stagnantes**. En effet, il est apparu que ces zones avaient un rôle prépondérant dans le fonctionnement des écosystèmes. Tout d'abord, celles-ci possèdent un rôle de filtration pour l'eau potable. La végétation aquatique agit comme agent épurateur et sert de support aux colonies bactériennes assurant une épuration de l'eau qui traverse lentement les colonies végétales installées. Les éléments polluants comme les nitrates sont ainsi absorbés par les plantes. Ces zones stagnantes, et leur végétation, possèdent également un rôle important de zone tampon réduisant les dommages des crues en cas d'inondation. Plus récemment, elles ont été considérées comme éléments irremplaçables dans l'environnement pour sa biodiversité, la disparition d'un grand nombre de ces habitats ayant été associée à une perte de la biodiversité.

Concernant les populations de moustiques, la **gestion de ces zones remarquables** nécessite trois approches. Dans un premier temps, il faut gérer les espèces invasives qui sont l'une des principales sources de déséquilibre, et donc de dysfonctionnement de ces zones naturelles sensibles. Ensuite, il faut réussir à détecter rapidement l'apparition de populations

résistantes aux traitements limitant la pullulation. L'un des derniers objectifs est de détecter l'apparition d'espèces nouvelles potentiellement nuisibles. L'objectif majeur de cette lutte est une gestion propre et raisonnée de ces zones qui prend en compte les 3 points précédemment cités afin de diminuer la nuisance des moustiques, le tout à un coût réaliste. C'est l'objectif des organismes de gestion des zones humides.

II. Organisme français de la lutte intégrée contre les moustiques

En France, l'organisme chargé de ce contrôle est l'**Entente Interdépartementale pour la Démoustication** (E.I.D.). L'abandon du milieu rural par les populations, avec d'abord l'abandon de l'utilisation des marais, et en parallèle l'avènement d'une société de loisirs et du confort ont entraîné la création de ces E.I.D. Il en existe trois en France : une sur le littoral méditerranéen basée à Montpellier, une autre sur le littoral atlantique basée à Nantes, et enfin une troisième en Rhône-Alpes située au nord du lac du Bourget à Chindrieux. Plus spécifiquement en Rhône-Alpes, nous travaillons en partenariat avec l'E.I.D. Ain, Isère, Rhône, Savoie. Cette E.I.D. a comme mission prioritaire de **lutter contre les nuisances provoquées par les moustiques**.

Le choix de la lutte intégrée par ces organismes nécessite un personnel qualifié. En effet, la lutte intégrée est basée sur l'observation, la réactivité et la mise en œuvre à tout instant des moyens de lutte les mieux adaptés. Une **observation hebdomadaire** des différents gîtes permet de surveiller leur rythme de mise en eau, les fluctuations de température et les éclosions de larves de moustiques. L'identification et la localisation des sites de pontes est nécessaire. Toutes ces connaissances sont un point de départ nécessaire pour savoir quand telle espèce va émerger. Il faut donc en permanence, pendant toute la saison favorable, effectuer une observation des gîtes larvaires, surtout au moment des pluies importantes ou de la fonte des neiges. La présence de larves de moustiques, leur nombre ainsi que leur stade de développement permettent de déterminer les moyens à mettre en œuvre pour le traitement. L'E.I.D. traite surtout des larves de moustiques d'eau temporaire : les *Aedes* sont les plus importants dans nos vallées fluviales, ils sont associés à des espèces du genre *Ochlerotatus*, *Culiseta*, *Anopheles*, et même du genre *Coquilleltidia*. Les sites et les populations ainsi identifiés, les modes d'intervention, les insecticides les plus adaptés et les jours les plus favorables pour traiter sont déterminés à l'avance.

Il est possible d'envisager cette lutte **au niveau des œufs** mais cette méthode a l'inconvénient d'être non sélective et de concerner tous les œufs d'insectes : elle n'est donc pas utilisée. **Au stade nymphal**, aucune nourriture n'est absorbée par l'animal, il est donc impossible de lui faire ingérer une substance toxique. Les produits solubles dans l'eau des gîtes et agissant par contact ne sont pas sélectifs et agissent sur une partie de la faune compagne du moustique. Il n'existe pas de substance sélective des moustiques **au stade adulte**. Cette méthode n'est pas utilisée en France sauf cas exceptionnel où le développement s'est prolongé jusqu'à l'état adulte, et qui créerait une nuisance fortement ressentie (exemple de La Camargue, et plus récemment de La Réunion). Enfin, **au stade larvaire** l'insecte se nourrit sans arrêt, en balayant de ses brosses buccales les particules végétales ou animales qui se trouvent dans son périmètre immédiat. Les stratégies de lutte contre les moustiques se concentrent sur ce stade en utilisant le larvicide à la fois le plus sélectif possible et le moins rémanent. En outre, c'est à ce stade larvaire que le moustique occupe un espace géographique minimum et qu'il est le plus facilement localisable.

Le meilleur moyen d'**éviter l'apparition de résistance** des moustiques aux insecticides est d'employer des approches complexes au niveau du contrôle des gîtes larvaires : tests fréquents de la sensibilité des populations aux insecticides, alternance des insecticides utilisés, évitement de molécules conduisant à la persistance de faibles concentrations d'insecticides dans le milieu. D'importantes réflexions ont amélioré les stratégies déployées dans les gîtes à moustiques en respectant l'écosystème et en réduisant le problème. En cas de crise aiguë, ces organismes de gestion peuvent également utiliser des produits chimiques contre les adultes lorsque les populations de moustiques sont trop importantes et/ou lorsque le risque de transmission de pathogènes au sein de la population est élevé (ex : situation de crise sur l'île de La Réunion début 2006).

III. La lutte biologique

Une méthode alternative à la lutte chimique est l'utilisation d'organismes vivants, autrement dit la lutte biologique, contre les moustiques, soit par prédation, soit par infection. La définition officielle de l'OILB-SROP stipule que la lutte biologique est l'**utilisation d'organismes vivants** pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs. Celle-ci s'illustre de différentes manières. La lutte par entomophage, qu'il soit parasitoïde ou ravageur, s'effectue par l'introduction d'un animal ravageur de l'organisme cible. La lutte microbiologique est l'utilisation de microorganismes (champignons, bactéries) qui infectent la cible souvent par ingestion. Si l'organisme antagoniste doit être lâché ou inoculé (en grand nombre) à chaque fois que l'effectif du ravageur croît dangereusement, c'est la lutte biologique inondative. Enfin, aux frontières de la lutte biologique ; la lutte autocide (encore dénommée lutte par mâles stériles) a pour principe l'introduction en grand nombre, dans une population naturelle, d'individus mâles de la même espèce rendus stériles mais au comportement sexuel intact.

Deux grands types de luttes biologiques ont été utilisés à l'encontre des moustiques. La première méthode biologique est l'utilisation d'un poisson prédateur, la gambusie (*Gambusia holbrooki*), qui a souvent été utilisée mais avec plus ou moins de succès (Pates et Curtis 2005). Ce poisson est un prédateur généraliste à utiliser avec grande précaution pour éviter les dommages sur les autres organismes aquatiques. D'autres formes de contrôles biologiques ont été tentées avec d'autres espèces de poissons, de champignons, de bactéries, de nématodes, des parasites protozoaires, des insectes prédateurs... mais peu d'entre elles ont été concluantes et donc adoptées.

La deuxième méthode est l'utilisation d'organismes microbiens tels que le *Bacillus sphaericus* (Bs) et le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti). Ces bacilles sont d'ailleurs considérés comme des agents de contrôle biologique efficace (Becker 1998). Ils agissent sur les larves des moustiques, des simuliides et des diptères en général et sont aujourd'hui utilisés dans un large panel de gîtes larvaires, du fait de leur efficacité et leur spécificité qui respectent largement la faune compagne. D'ailleurs, le Bt est le micro-organisme le plus utilisé comme bio-insecticide et représentent plus de 90% du marché des bioinsecticides, mais seulement 2% à peine du marché global des insecticides (Fargues et Bourguet 2005).

D- Problématique

I. Questions du gestionnaire

Dans ce contexte de lutte intégrée, l'E.I.D. Rhône-Alpes s'est tournée vers une lutte totalement biologique pour lutter contre les moustiques. Cet organisme de gestion utilise le *Bti* depuis 20 ans. Et bien qu'à ce jour, aucune population de moustique ne soit apparue résistante au *Bti*, ce gestionnaire s'interroge sur la possibilité d'apparition de populations résistantes aux traitements insecticides ; c'est auprès d'un organisme public de recherche, (notre laboratoire) qu'il se tourne pour toute question scientifique. Mon sujet de thèse s'inscrit dans la suite d'une collaboration scientifique constante depuis 40 ans entre l'E.I.D. et notre laboratoire de recherche. Une des questions de l'E.I.D. est de savoir s'il existe, dans les zones humides sous sa responsabilité, des populations de moustiques résistantes au *Bti*.

II. Objectifs de thèse

Afin de situer au mieux ma problématique, il est nécessaire de la re-situer historiquement parmi les avancées scientifiques liées à l'histoire de notre laboratoire. Avant de s'intéresser aux problèmes de résistances aux insecticides, les premiers travaux se sont surtout intéressés aux relations plantes-insectes. Dans la région Rhône-Alpes (France), les gîtes à moustiques sont souvent entourés d'une végétation arborescente (Pautou et Girel 2000) et les xénobiotiques contenus dans la litière de ces feuilles en décomposition et consommés par les larves de moustiques semblent impliqués dans la ségrégation écologique des populations de moustiques (David *et al.* 2000b). Cette ségrégation écologique est modulée par la capacité des larves de moustiques à tolérer ces xénobiotiques naturels (Meyran *et al.* 2002). Au plan appliqué, l'existence d'une telle polyvalence aurait des répercussions importantes sur la gestion durable des traitements larvicides des populations de moustiques. En effet, une meilleure connaissance de la genèse de la résistance larvaire aux xénobiotiques en général et aux insecticides en particulier pourrait utilement permettre l'amélioration des stratégies de lutte.

Des travaux antérieurs (Guy Pautou dans les années 1980-1990, Jean-Claude Meyran, Delphine Rey, Jean-Philippe David et Mathieu Tilquin successivement depuis le milieu des années 1990) ont laissé supposer qu'il existait une différence de sensibilité des larves aux insecticides en fonction de leur gîte d'origine, les larves originaires de gîtes herbacées étant moins tolérantes que celles provenant des gîtes arborescents. Ma thèse est dans la continuité de 3 autres thèses précédemment soutenues au laboratoire sur la résistance *in natura* (Rey 2000), sur la résistance en conditions contrôlées (David 2002) et sur l'étude de la toxicité d'une toxine naturelle (Tilquin 2003).

A la suite des trois thèses mentionnées ci-dessus, nous avons émis l'hypothèse que dans les zones humides rhône-alpines gérées par notre partenaire, des lignées résistantes étaient apparues au cours du temps. Il fallait alors être capable de mettre en évidence la présence *in natura* de telles lignées et comprendre par quels mécanismes ces résistances étaient apparues. Travailler au laboratoire sur une lignée facile à élever (*Aedes aegypti*, souche Bora-Bora) nous a permis d'avancer dans l'analyse de ces mécanismes, ce qui aurait été proprement impossible avec des lignées prélevées dans la nature. Il fallait enfin revenir sur le terrain environnemental pour tenter de valider *in natura*, sur les espèces autochtones, si les

mêmes mécanismes de résistances observés à l'aide de l'espèce de laboratoire étaient ceux qui s'exprimaient sur le terrain.

Ainsi notre travail d'écotoxicologie s'inscrit dans une démarche rythmée par trois temps : 1) une observation de déséquilibres fonctionnels sur le terrain, 2) une analyse scientifique au laboratoire de ces dysfonctionnements, et 3) une étape de validation des résultats de laboratoire *in natura*.

Après avoir analysé dans une première partie au laboratoire, les mécanismes d'acquisition possible d'une tolérance aux insecticides téméphos, *Bti* et litière végétale naturellement toxique sur des larves d'*A.egypti*, nous tenterons de mettre en évidence si de tels mécanismes sont possibles en situations environnementales en utilisant des populations sauvages d'*Ochlerotatus cataphylla* et d'*Aedes rusticus*. Enfin, nous présenterons nos observations concernant la possible apparition de mécanismes de tolérance aux insecticides liée à la présence dans la nature de xénobiotiques non insecticides issus de ce qu'il est courant d'appeler des pollutions diffuses.

Chapitre 2 : Méthodes utilisées

La démarche expérimentale utilisée dans ce travail est celle classiquement employée dans l'équipe de recherche Perturbations Environnementales et Xénobiotiques, à savoir :

- identifier les dysfonctionnements environnementaux sur le terrain,
- analyser au laboratoire sur des espèces modèles (ici *Aedes aegypti*) les mécanismes à l'origine de ces perturbations,
- revenir sur le terrain pour confronter les résultats de laboratoire avec ceux obtenus *in natura* (ici *Ochlerotatus cataphylla*, *Aedes rusticus*).

A- Modèles biologique

I. *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)

Aedes aegypti (Linnaeus, 1862), espèce invasive dans les pays à climat tempéré, est un vecteur de la fièvre jaune qui est aujourd'hui classé comme une importante maladie ré-émergente (Robertson *et al.* 1996).

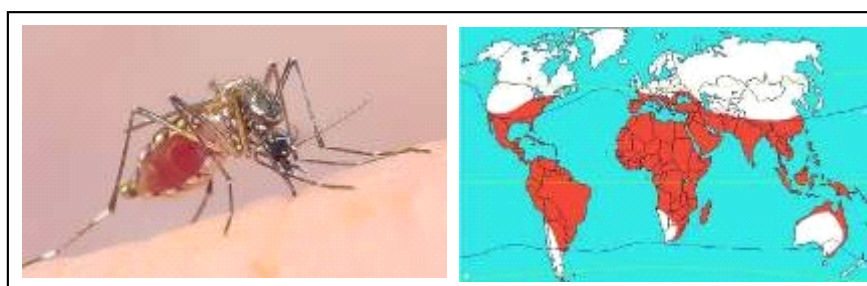


Figure 4. *Aedes aegypti* et sa carte de répartition

Une souche d'*A. aegypti* (souche Bora-Bora) a été choisie comme modèle expérimental de laboratoire pour cette étude car c'est une espèce facile à élever en laboratoire avec une longue conservation des œufs (au sec et à l'obscurité) permettant d'obtenir des larves en grand nombre facilement calibrables pour des expériences d'éco-toxicologie et d'enzymologie qui nécessitent un grand nombre de répétitions. *A. aegypti* a été élevé en insectarium dans les conditions suivantes : 25°C, 80% d'humidité relative et 16h/8h de lumière artificielle/nuit. Le temps d'une génération, dans nos conditions d'élevage, est de 3 semaines environ. La nourriture standard d'élevage pour les larves est des croquettes pour lapin (Le Père François, Morestel, Isère, France).

Cette lignée a également été choisie pour sa faible tolérance à la litière toxique de référence (Rey *et al.* 1999), similaire à celle des espèces et des taxons les plus sensibles en Rhône-Alpes (David *et al.* 2000c), et aux autres xénobiotiques (Andrande et Modolo 1991).

II. Sélection d'une souche d'*A.aegypti* tolérant la litière toxique

Afin d'obtenir des larves capables de supporter des composés toxiques, nous avons sélectionné des lignées d'*A. aegypti* de la manière suivante. A chaque génération, une population d'*A. aegypti* est soumise à une sélection par notre litière toxique. Cette sélection débute avec un nombre de larves au moins égal à 2000 individus. Les larves de stade 4 sont ensuite nourries avec de la litière toxique mélangée à la nourriture standard (8/92). Le processus de sélection est stoppé lorsque la mortalité atteint 80% et plus. Les larves vivantes sont collectées puis élevées dans des conditions standards pour donner la génération suivante sur laquelle la sélection est poursuivie avec les mêmes principes.

III. *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera, Culicidae)

Notre travail a aussi concerné des espèces dont l'élevage en laboratoire n'est, pour l'instant, pas possible. Ainsi, des larves d'*O. cataphylla* (Dyar, 1916) sont collectées entre mars et mai 2004 dans divers gîtes de l'étage subalpin en Isère (Rhône-Alpes, France). Dans ce cas, nous avons recours à une capture sur le terrain (Figure 5).

Callot (1944) avait décrit des biotopes larvaires dans le Massif Central, et Roman (1963) noté son existence dans le Jura (Gilot *et al.* 1979). Mais les premiers auteurs à trouver et à décrire les biotopes larvaires occupés par cette espèce dans les Alpes remontent « seulement » à 1968 et la description de cette espèce comme n'étant pas exclusivement orophile en France à 1979 (Sinègre *et al.* 1967).

O. cataphylla a une très large répartition altitudinale, puisqu'il existe depuis l'étage collinéen jusqu'à l'étage alpin. Le biotope régional le plus élevé a été trouvé par Serra-Tosio en Vanoise à 2390 m.. Cette espèce trouve des conditions optimales de développement dans l'étage montagnard des Alpes du Nord et du Jura. Elle est également présente dans les Alpes du Sud (Peira-Cava, 06). Le gîte le plus méridional trouvé dans la vallée du Rhône est à Chateaufort-du-Rhône (26) (Gilot *et al.* 1979).



Figure 5. Photos d'*O. cataphylla* et d'un de ses gîtes

Les adultes sont responsables d'une forte nuisance dans certains villages de l'étage montagnard. La prolifération de cette espèce suscite des interventions localisées du service de démoustication. Les larves sont plus particulièrement présentes dans les prairies mésohygrophiles à *Ranunculus repens*, dans les Cariçaies typiques, dans les Aulnaies, et plus rarement dans les groupements à *Populus alba*, voire dans de minimes dépressions sans végétation, parfois dans les bras morts des torrents mais les gîtes larvaires peuvent être de très grandes dimensions et receler de nombreuses larves.

IV. *Aedes rusticus* (Diptera, Culicidae)

A. rusticus (Rossi, 1790) est une espèce prédominante dans les gîtes préalpins à couverture arborescente importante, mais également présente dans les gîtes à végétation mixte, où l'on trouve à la fois des essences arborescentes et herbacées (Rey *et al.* 2000). Cette espèce est remarquable par sa capacité à passer l'hiver sous forme larvaire sous la glace (Figure 6).

La répartition et la biologie de cette espèce ont été évoquées dans plusieurs travaux (Maire 1971; Gilot *et al.* 1979). Les prospections confirment sa relative fréquence dans le midi méditerranéen également. Les observations faites dans le Var paraissent montrer que, dans certains cas, le cycle larvaire peut-être de plus courte durée que dans les forêts hygrophiles de la plaine alluviale du Rhône.



Figure 6. Quelques gîtes typiques occupés par *A. rusticus* en Rhône-Alpes.

B- Réalisation des bioessais

Trois composés larvicides ont été étudiés afin de comparer la sensibilité des larves : le bactério-insecticide *Bti* (Bactimos, Bayer, Lyon, France), l'insecticide organophosphoré de synthèse téméphos formulé (Abate 500E, Bayer) et un insecticide naturel issu de feuilles en décomposition (Rey *et al.* 2001; Tilquin *et al.* 2002a; Tilquin *et al.* 2002b; Tilquin *et al.* 2004). Ce choix est lié à l'histoire de la démoustication en Rhône-Alpes.

I. Evaluation de la mortalité

Les **bioessais** sont réalisés en triplicata dans des gobelets en plastique contenant chacun 25 larves de stade 4. Chaque gobelet contient 50 mL de solution aqueuse (eau du robinet à 27°C pour *A. aegypti*, eau du robinet à la température de l'eau de prélèvements pour les espèces de terrain) à différentes concentrations en téméphos, *Bti* et litière toxique (Figure 7). Les taux de mortalité sont mesurés après des expositions aux insecticides allant de 2 heures à plus de 48 heures suivant la nécessité des expérimentations. Les larves ne sont pas alimentées pendant les bioessais.

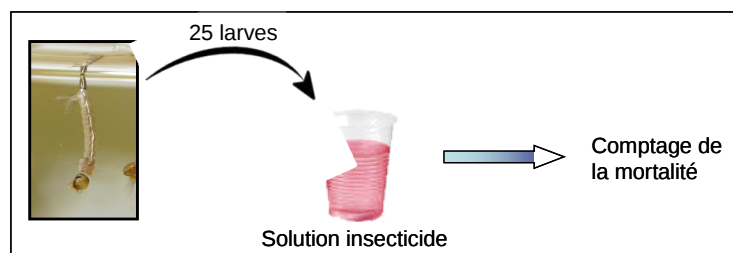


Figure 7. Techniques des bioessais

Ces comptages permettent d'obtenir la sensibilité larvaire, exprimée par le taux de mortalité (%) en fonction du temps d'exposition et de la dose du toxique. Lorsque le taux de mortalité des témoins dépasse 20%, le test doit être renouvelé. Lorsque ce même taux est compris entre 5 et 20%, une correction est effectuée grâce à la formule d'Abbott (Abbott 1925) :

$$\text{Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{Mortalité des larves traitées} - \text{mortalité des témoins}}{100 - \text{mortalité des témoins}} \times 100$$

II. La pré-exposition

L'effet sur la tolérance larvaire d'une pré-exposition est mesuré en utilisant des bioessais classiques (Rey *et al.* 1999). Des groupes de 25 larves sont maintenus à 25°C dans des gobelets en plastique contenant 50 mL d'eau de robinet (témoin) ou des suspensions d'eau fraîchement préparées avec les solutions insecticides. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité (\pm SE).

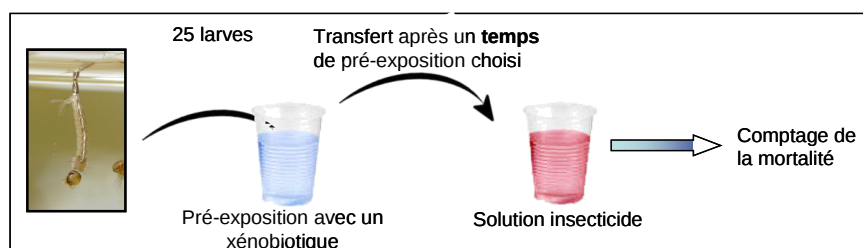


Figure 8. Méthode de pré-exposition et bioessais

La pré-exposition correspond à une première mise en contact des larves avec un produit donné (ici les différents xénobiotiques choisis) à des concentrations telles que celles-ci ne provoquent pas ou peu de mortalité en fin de pré-exposition (Figure 8). Ces concentrations optimales d'induction sont déterminées à partir des cinétiques complètes de mortalité, obtenues grâce à des bioessais réalisés en présence de chacune des molécules toxiques.

Dans un deuxième temps, les larves sont mises en contact avec une dose toxique d'un autre xénobiotique, que ce soit un insecticide à une dose sublétales, un herbicide, un fongicide ou un polluant n'entraînant aucune mortalité. Il est ainsi possible de comparer la sensibilité

des souches pré-exposées à celle de souches non exposées, et ainsi de déterminer s'il existe un effet de cette pré-exposition sur chacun des insecticides testés.

C- Dosages biochimiques des activités enzymatiques de détoxication

Nous avons choisi de travailler sur 3 des familles enzymatiques les plus connues pour leurs rôles dans les résistances aux insecticides, à savoir les monooxygénases à cytochromes P450 (cyt P450), les glutathion-S-transférases et les estérases α et β .

Les cyt P450 mettent en jeu des réactions de monooxygénation dans lesquels des atomes d'oxygène sont incorporés dans le substrat de la molécule pendant que les autres sont réduits par 2 électrons (Feyereisen 1999). Ainsi, ces hémoprotéines situées dans les membranes du réticulum endoplasmique rendent les xénobiotiques plus polaires. Les cyt P450 ont déjà été suspectés d'intervenir dans des processus de détoxication par les larves de moustiques de la poudre de litière toxique (David *et al.* 2000c), et sont fréquemment mentionnés dans les travaux sur la résistance chimique (Brattsten 1988 ; Scott *et al.* 1998; Mougin *et al.* 1991).

Les estérases hydrolysent des liaisons esters carboxyliques, empêchant ainsi les xénobiotiques d'atteindre efficacement leurs cibles. Ces enzymes catalysent l'hydroxylation (α ou β) de carboxyl-esters par addition d'eau (Ollis *et al.* 1992). Les estérases décrites chez les moustiques du genre *Culex* sont classées selon le critère incluant la nature du substrat α/β naphtyl-acétate hydrolysé (Vaughan et Hemingway 1995). L'implication des estérases dans la résistance aux insecticides organophosphorés par métabolisation du substrat ou séquestration de l'insecticide se traduit par une surproduction enzymatique (Mouches *et al.* 1986; Cuany *et al.* 1993). Elles sont en particulier impliquées dans la détoxication de différents composés chimiques par les larves de moustiques (Walker et Mackness 1983).

Les GSTs sont des enzymes multifonctionnelles impliquées dans l'étape de conjugaison (Hemingway *et al.* 2004) du « glutathion réduit » à un grand nombre de xénobiotiques (Rey *et al.* 1999; Yu 1999). La résistance due à une augmentation de l'activité des GST a été mise en évidence pour la première fois sur des organophosphates chez de nombreuses espèces d'insectes (Hayes et Wolf 1990), et plus récemment chez *Anopheles subticus* (Hemingway *et al.* 1991). Les GST sont impliquées dans les résistances aux pyrethroïdes (Vontas *et al.* 2001) et aux espèces réactives de l'oxygène (Sawicki *et al.* 2003) chez de nombreuses espèces d'insectes, et au DDT chez des espèces de moustiques (Grant *et al.* 2001).

Les activités des cyt P450 sont exprimées en quantité de produits formés par larve, les activités estérasiqes et GST sont exprimées en quantité de produits formés par mg de protéines issus d'extraits enzymatiques. Les quantités de protéines sont déterminés suivant la méthode décrite par Bradford (Bradford 1976) avec la sérum-albumine bovine comme référence (Roche Diagnostics, Meylan, France).

I. Mesures des activités monooxygénases à cytochrome P450

Les activités biochimiques des cyt P450 sont mesurées sur des larves vivantes en utilisant la méthode de De Sousa (De Sousa *et al.* 1995) modifiée pour l'utilisation de plaques à 96 puits (Figure 9).

L'activité éthoxycoumarine-*O*-dééthylase (ECOD) est mesurée par la transformation de la 7-éthoxycoumarine (7-EC) en 7-hydroxycoumarine (7-OHC). Les larves vivantes sont incubées individuellement pendant 4h à 30°C dans 100 µL de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,2) contenant 0,4mM de 7-EC (Sigma L'Isle d'Abeau, France). La réaction est stoppée par addition de 100 µL d'une solution tampon glycine (0,1 mM, pH = 10.4) / éthanol (v/v, 1/1). Les larves sont alors enlevées des puits de la microplaque, et la fluorescence du milieu de réaction est mesurée (lecteur de fluorescence de microplaque, Fluoroskan Ascent, Labsystems, Helsinki, Finlande) avec des filtres d'excitation à 380 nm et d'émission à 480 nm (energy, 7 V).

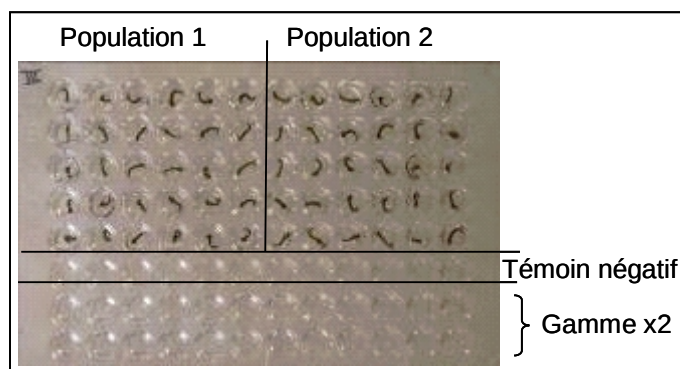


Figure 9. Photographie d'une microplaque à 96 puits permettant la mesure des activités cyt P450 (une larve vivante par puits)

Les activités enzymatiques sont exprimées en pmoles de 7-OHC produites/ larve/ unité de temps selon une courbe standard obtenue dans les mêmes conditions avec des concentrations connues de 7-OHC (Sigma).

II. Préparation des extraits enzymatiques

Les activités estérasiqes et GST sont mesurées sur des extraits de larves, obtenus par broyage (20 larves dans 200 µL de solution de tampon phosphate 50 mM, Merck, pH 7,2 ; acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA), 1mM, Sigma ; dithiothreitol (DTT), 0,1 M, Sigma ; phénylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 0,4 mM, Sigma). Après centrifugation à 14000 rpm pendant 20 minutes, les phases aqueuses sont récupérées et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. La teneur protéique de ces extraits est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford 1976).

III. Mesures des activités glutathion-S-transférases

L'activité enzymatique des GSTs est déterminée en suivant par spectrophotométrie la conjugaison du 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma) avec le glutathion (méthode microfluorimétrique (Bouvier *et al.* 1998) (Figure 10).

La réaction est réalisée dans un système plaque à 96 puits contenant 4 μL de solution d'extraction contenant les enzymes, 184 μL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,2), 2 μL de glutathion réduit (GSH, Sigma) et 10 μL de CDNB (30mM). L'incubation se déroule à 30°C. Le changement de la densité optique résultant de la liaison entre le groupement thiol du glutathion et le CDNB (substrat) est mesuré à 340 nm à la mise en contact (t0) et après 1 minute de réaction (t1), avec un spectrophomètre pour microplaque Power Wave 200 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Pour les mesures témoins, nous suivons le même protocole en remplaçant les solutions d'extractions contenant les enzymes par la solution d'extraction seule (blanc d'expérience).

Les résultats sont exprimés en nanomoles de produits formés (conjugué du glutathion) par milligramme de protéine et par minute.

IV. Mesure des activités estérasiques

Les activités estérasiques sont mesurées avec une méthode microfluorimétrique (Bouvier *et al.* 1998), en mesurant la production d' α - et de β -naphthol à partir d'un substrat d' α - et de β -naphthyl acétate (NA) (Sigma).

La réaction est effectuée en plaques multipuits, chaque puit contenant 90 μL de la solution de tampon d'extraction, 90 μL de tampon phosphate (50 mM, pH 6,5) et 0,1 mM d' α - ou de β -NA. Le temps d'incubation est 15 minutes à 30°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 20 μL de la solution de Fast-Garnett (10 mM, sel de Fast Garnett GBC, Sigma). Les absorbances du milieu de réaction sont ainsi enregistrées à 527 nm pour l' α -naphthyl acétate et à 505 nm pour le β -naphthyl acétate en utilisant un lecteur de microplaque Metertech Σ 960 (Bioblock, Illkirch, France) (Figure 10).

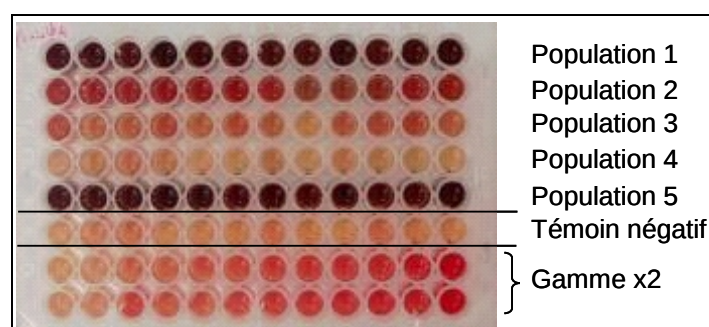


Figure 10. Dispositif expérimental (microplaque 96 puits) illustrant la mesure des activités GST, α - et β - estérases (ici photo du protocole β -estérases).

Les résultats sont exprimés en pmoles d' α - ou de β -naphthol formé par microgrammes de protéine larvaire.

D- Quantification de l'expression de gènes CYP

I. Pré-exposition à la litière toxique

Dans le but de déterminer 1) l'effet inductif potentiel de la litière toxique sur la tolérance larvaire, 2) les niveaux d'activités des cyt P450 et, 3) l'expression des gènes *CYP*, des groupes de 100 larves de stade 4 sont pré-exposés pendant 48h avec une poudre mixte réalisée avec la nourriture standard et la litière toxique. Chaque essai contient 100mg de poudre/150mL d'eau. L'effet dose du matériel toxique est ensuite étudié par pré-exposition des larves pendant 48h à une poudre contenant 0% (témoins), 2.5%, 7.5% ou 10% de litière toxique. L'effet temps de la pré-exposition est étudié en utilisant de la poudre toxique à 5% pendant 0h, 24h, 48h et 72h.

II. Caractérisation de gènes codant pour des monooxygénases à cytochrome

P450 chez *A. aegypti*

Les ARN totaux sont extraits à la fois sur les larves pré-exposées et sur les larves témoins dans du TRIzol reagent (Gibco BRL Invitrogen, Gaithersburg, USA) avec 100 mg de larves fraîches/ml TRIzol selon les instructions du vendeur. Les ARN messagers (ARNm) sont isolés avec un kit « PolyAttract mRNA isolation » (Promega, Charbonnières, Paris) à partir d'1 mg d'ARN totaux et resuspendu dans 50 µL d'eau « RNase free ». Les ADN complémentaires (ADNc) simple brin sont alors synthétisés par rétro-transcription en utilisant l'enzyme M-MLV (Promega) à 42°C pendant 60 minutes. Deux paires d'amorces dégénérées correspondant à des régions fortement conservées de gènes *CYP* sont utilisées pour obtenir des fragments de *CYP4* (CYPUp1dég: GAYACNTTYATGTTYRARGGNCAYG et CYPDo1dég: GCRAAYTTYTGNCDDATRCARTT, (Dauphin Villemant *et al.* 1999) et de *CYP6/CYP9*(CYP6Up1dég : CARGYGTTYVTGTTYTTCNTBGC and CYP6Do1dég : SCCSAAYCGCADHCCRATRCA).

Les conditions suivantes de PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérase) ont été initialement utilisées : 94°C pendant 5 minutes, puis 35 cycles à 94 °C pendant 30 s., 50 °C pendant 30 s. et 72 °C pendant 30 s. et enfin une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les produits PCR sont alors purifiés à partir d'un gel agarose à 1,2% (kit gene clean II kit, Bio101, Inc.), et clonés dans un vecteur pCR-II Topo (Invitrogen) ou un vecteur pGEM-T easy (Promega). Les séquences ont été obtenues par Génome Express (France) avec les amorces T3, T7 ou M13.

La séquence génomique du gène *CYP6AL1* a été obtenue par le criblage d'une banque d'*Aedes aegypti* en chromosomes artificiels de bactérie (BAC), obtenue par D. Severson (Jimenez *et al.* 2004). L'isolement de clones positifs issus des clones BAC est obtenu par des PCR avec des amorces spécifiques de *CYP6AL1*. Une première PCR de criblage est réalisée sur un pool d'ADN purifié de BAC, suivie d'une deuxième PCR de criblage sur des clones individualisés de BAC resuspendus dans 10 µL d'eau purifiée, après purification à 95°C pendant 10 minutes. La séquence génomique entière du gène *CYP6AL1* est obtenue par le séquençage de l'ADN BAC isolé de clones positifs de BAC (Large Construct DNA extraction kit, Qiagen) utilisant des amorces spécifiques du gène. La séquence entière de l'ARNm de

CYP6AL1 est obtenue par séquençage d'un fragment de 1,6kb obtenu à partir des ADNc d'*Aedes aegypti*. Les séquences sont analysées avec Lasergene 5.1 (DNASTAR inc., Madison, USA), GeneJockey (Biosoft, Cambridge, UK) et également en se basant sur les données du séquençage du génome d'*A. aegypti* (Broad MCS homepage: <http://www.broad.mit.edu/seq/msc/>).

La recherche des homologies de séquences des cyt P450 est réalisée grâce au site internet « cytochrome P450 » de l'INRA (<http://P450.antibes.inra.fr>). L'analyse des éléments de transcription de *CYP6AL1* est réalisée avec le logiciel « Transcription Element Search System » (TESS homepage: <http://cbil.upenn.edu/tess>) avec les paramètres par défaut sur 1200 paires de base à partir du codon initial supposé (ATG).

III. Etude de l'expression des gènes CYP

1- Etude de l'expression par northern blot

Des analyses par northern blot sont effectuées comparativement sur des larves pré-exposées à la litière toxique (5%) pendant 48h et à des larves nourries avec de la nourriture non toxique (témoins). Après pré-exposition, les larves sont récupérées, rincées deux fois avec de l'eau stérile, et immédiatement utilisées pour l'extraction d'ARN totaux (comme décrit plus haut). Les ARNm sont ensuite purifiés avec le kit «PolyAttract mRNA isolation » (Sigma) et 5 µg d'ARNm séparé sur un gel de formaldéhyde à 1.2% et transféré ensuite sur une membrane nylon chargée positivement (Roche Diagnostics). L'hybridation s'effectue une nuit à 50 °C avec du tampon High SDS (Gibco BRL) contenant des ADN marqués à la digoxygénine (DIG) spécifiques. *RPL17A* correspond au gène codant la protéine ribosomale RPL17A (GenBank accession no. **AY432192**) d'*Aedes aegypti*. Après hybridation, plusieurs rinçages stringents (3 fois à 2x SSC avec du SDS 0,1% SDS à température ambiante suivis par 4 rinçages à 0,5x SSC à 0,1% à 68°C) permettent d'éliminer l'excès de sondes non fixés spécifiquement. Les sondes fixées spécifiquement sont détectées par un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline et par une révélation chimioluminescente (substrat de la phosphatase alcaline donnant un produit luminescent) avec kit de détection de la DIG (Roche Diagnostics).

2- Etude par RT-PCR semi quantitative

Les RT-PCR semi-quantitatives sont utilisées pour estimer les niveaux d'expression du gène *CYP6AL1* aux différents stades de vie du moustique. Les ARN des larves de stades 1, 2, 3 et 4, des nymphes et des adultes (50% de mâles et 50% de femelles) sont extraits sur du matériel biologique frais avec un kit d'extraction « SV Total RNA » (Promega). Les ADNc simples brins sont ensuite synthétisés avec la transcriptase reverse M-MLV (Promega) et l'amorce oligo-dT à 42°C pendant 60 minutes. Une paire d'amorces spécifiques du gène *CYP6AL1* est utilisée à une température de 60°C pour amplifier le fragment de 600 paires de bases de l'ADNc.

La même procédure est utilisée avec le gène *RPL17A*, utilisé à nouveau comme contrôle quantitatif. Les conditions de PCR suivantes sont choisies, pour nous donner à la fois un signal détectable par Southern blot et nous permettre de rester dans la phase exponentielle de la PCR : 94 °C pendant 5 minutes, puis 19 cycles (17 cycles pour *RPL17A*) à 94 °C pendant 30 s; 60 °C pendant 30s et 72 °C pendant 30 s et une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72 °C. Après migration de 10 µL des produits PCR sur un gel d'agarose à 1,2%, les fragments d'ADN sont transférés une nuit sur des membranes chargées positivement (Roche

Diagnostics). Les membranes sont ensuite hybridées individuellement avec des sondes spécifiques marquées à la DIG. Les hybridations sont réalisées suivant le même protocole que pour les northern blot. La procédure PCR semi-quantitative est répétée 3 fois avec des RT-PCRs indépendantes.

3- Etude par RT-PCR

Les RT-PCR sont utilisées pour identifier les principaux tissus et parties du corps où s'exprime le gène *CYP6AL1* chez les larves de stade 4. Les larves sont disséquées dans du tampon PBS froid et les tissus sont stockés dans du RNA*later* (Ambion) avant l'extraction d'ARN. Ces extractions, transcription réverse, et amplification par PCR sont réalisées comme précédemment décrit pour le gène de contrôle *RPL17A*. Seul le nombre de cycles change, passant respectivement de 19 à 35 cycles pour *CYP6AL1* et de 17 à 30 cycles pour *RPL17A*.

IV. Analyse des images et analyses statistiques

Un test de Student suivant l'hypothèse d'égalité des variances et avec un intervalle de confiance de 95% est utilisé pour tester la significativité des différences sensibilités larvaires à la litière toxique (N=6 pour les % de mortalité) et pour comparer les activités cyt P450 (pmoles 7-OHC formé/larve, N = 48) des larves pré-exposées et des larves témoins. Les tests statistiques ont été réalisés avec Minitab V 13.3 (Minitab Inc., Paris, France).

Les intensités de bandes obtenues avec les northern blot de *CYP6AL1* et les RT-PCR semi-quantitatives sont analysées avec le logiciel « Scion Image » (Scion corp., Maryland, USA) et les niveaux relatifs d'expression des fragments de *CYP6AL1* et de *RPL17A* sont déterminés pour chacun des échantillons. Les intensités des bandes correspondant au gène *CYP6AL1* sont d'abord normalisées avec *RPL17A*, et ensuite normalisées encore pour obtenir des valeurs de 1 chez les témoins (larves non exposées pour les northern blot, et adultes pour la RT-PCR semi-quantitative). Les résultats sont ensuite exprimés en expression relative par rapport aux témoins (moyenne \pm SE).

E- Méthodes statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec les logiciels suivants :

- Minitab (Minitab 12.0 Copyright 2005 Minitab Inc.)
- SPSS (Version SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc., 1989-2001). Chicago, IL, 350 USA)
- R (R: Copyright 2003, The R Development Core Team. Version 1.7.1 (2003-06-352 16))
- SAS (SAS 9.1.3 for Windows; SAS Institute, University of Arizona)
- Jump (JMP 5.0.1.2., A Business of SAS, Copyright 1989-2003 SAS Institute Inc.)

Nous avons utilisé les tests suivants :

- Tests de comparaison de moyennes (paramétriques, et non paramétriques).
- ANOVA et test pos-hocs associés.
- Tests GLM (modèle général linéaire) avec répétitions de mesures dans le temps.
- Test de corrélation.
- Tests de régression linéaire et tests de régression linéaire multiple.
- Tests 'split-plot design' (tests développés pour des expérimentations qui prennent en compte les facteurs aléatoires de choix des parcelles de terrain, et les effets blocs).

Chapitre 3 : Analyse des mécanismes de

résistance métabolique

Ce chapitre traite de la capacité des larves de moustique à tolérer des toxiques d'origines diverses (téméphos, *Bti*, litière toxique) et de la plasticité des enzymes de détoxification impliquées dans la tolérance. Ces études ont été réalisées sur une souche de moustiques *A. aegypti* de laboratoire. L'hypothèse d'une plasticité des enzymes de détoxification a été testée expérimentalement en mesurant l'effet d'une pré-exposition des larves à la litière toxique au sein d'une génération et l'effet d'une sélection par la litière toxique sur plusieurs générations. Le but de cette étude est d'analyser la possible acquisition de capacités de détoxification d'une souche de laboratoire. Nous partons de l'hypothèse que la fonction de tolérance peut être flexible et corrélée aux conditions d'exposition à un xénobiotique.

A – Induction et Sélection

Des larves d'*A. aegypti* et la litière toxique ont été utilisées pour cette étude. Ce sous-chapitre concerne l'étude des conséquences d'une pré-exposition à des doses non létales et d'une sélection avec la litière toxique sur la capacité des larves à tolérer par la suite des doses plus fortes de cette même litière toxique. Cette étude a été conduite d'un point de vue toxicologique et biochimique.

I. Effets d'une pré-exposition et d'une sélection par la litière toxique sur la mortalité liée à cette même litière toxique

Une courte pré-exposition (48 heures) à une dose sublétales de litière toxique (5% de la nourriture) entraîne une augmentation de la tolérance des larves à une exposition ultérieure à cette même litière toxique (Figure 11). Quelle que soit la durée de contact avec la 2ème exposition de litière toxique (2 à 5 heures), on observe une diminution significative de mortalité ($p < 0.05$). Cet effet est particulièrement important pour un temps court de contact (diminution de moitié) mais reste significatif jusqu'à 5 heures de contact.

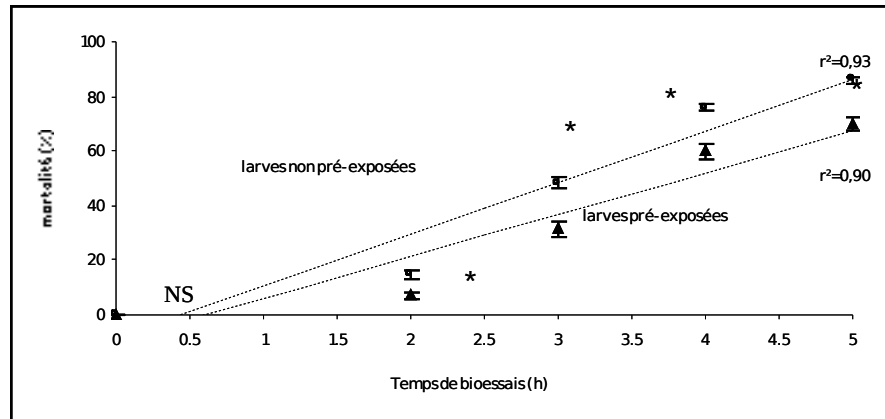


Figure 11. Effet d'une pré-exposition à la litière toxique sur la mortalité des larves d'*A. aegypti*. Les larves sont pré-exposées ou non à de la nourriture contenant 5% de litière toxique. La tolérance des larves est ensuite comparée en fonction du temps. Le bioessai est réalisé en exposant des lots de 50 larves à 0.08 g/L de litière toxique (% de mortalité exprimé en moyenne \pm SE, n=6). Les résultats du test t à une dimension est indiqué pour chaque temps d'exposition (NS, non significatif, *p<0,05).

Dans un deuxième temps, les conséquences d'une exposition à long terme à la litière toxique ont été étudiées. Des larves ont été « sélectionnées » par exposition à des doses létales de litière toxique pendant 8 générations. Une augmentation significative de la tolérance à la litière toxique est observée dès la 7ème génération de sélection (Figure 12). A la 8ème génération, nous pouvons observer une diminution de la mortalité de 50 % : 90% de mortalité pour les larves standards contre 45 % pour les larves sélectionnées.

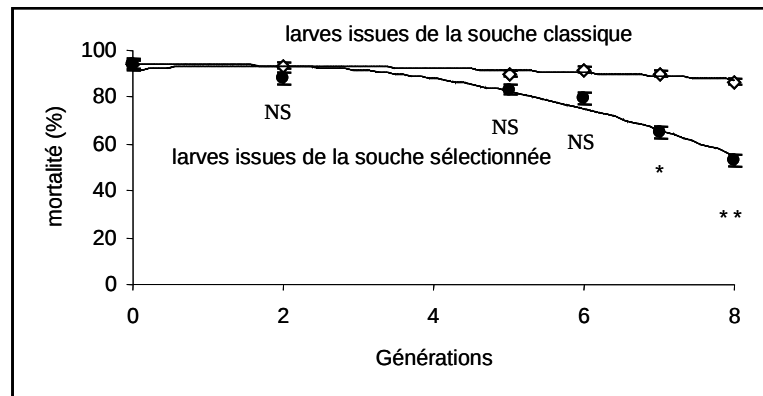


Figure 12. Evolution de la tolérance larvaire d'une souche sélectionnée avec la litière toxique ou non) d'*A. aegypti* à cette même litière toxique. Le bioessai est réalisé en exposant des larves 4h à 0.2g/L de litière toxique (% de mortalité exprimé en moyenne \pm SE, n=6). Les résultats du test t à une dimension est indiqué à chaque génération (NS, non significatif, *p<0,05, **p<0,01).

II. Conséquences de la pré-exposition et de la sélection avec la litière toxique sur les activités enzymatiques de détoxication

Nous avons ensuite mesuré les activités enzymatiques totales de détoxication, après soit une pré-exposition courte, soit une sélection par de la litière toxique à une dose non létale.

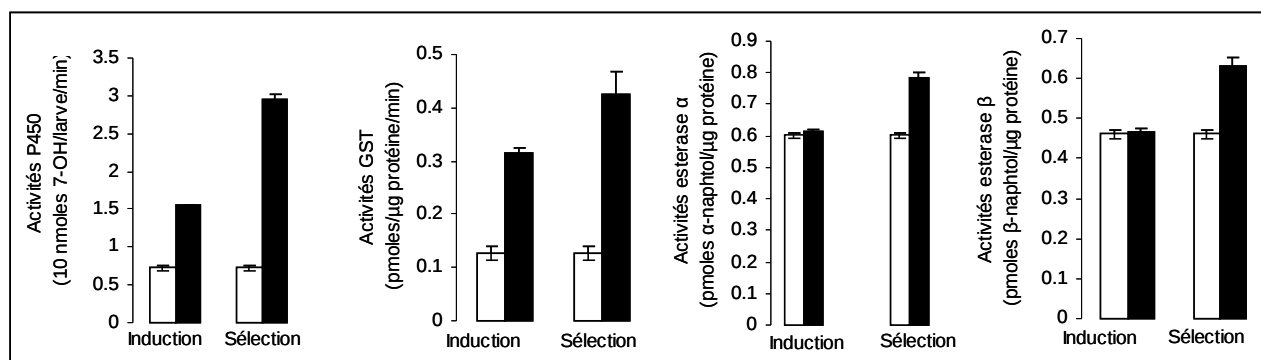


Figure 13. Effet d'une pré-exposition (48 heures à de la nourriture additionnée de 5% de litière toxique) et d'une sélection à la litière toxique sur la moyenne des activités enzymatiques de détoxication chez les larves d'*A. aegypti*. Les différences de mortalité ont été analysés par un test t de comparaison de moyenne (N=88 pour les cyt P450, N=12 pour les GST et les estérases, NS, non significatif, **p<0,01, ***p<0,001). En blanc les larves témoins, en noir les larves induites ou sélectionnées.

Chez les larves pré-exposées, on observe une augmentation significative des activités cyt P450 et GST par rapport aux larves témoins, mais aucune différence significative n'est observée pour les estérases α et β (Figure 13). Les activités cyt P450 et GST chez les larves pré-exposées sont respectivement doublées et triplées.

Chez les larves sélectionnées, toutes les activités enzymatiques de détoxication étudiées, incluant cette fois les estérases, sont significativement augmentées après 8 générations par rapport aux larves témoins (Figure 13). Les activités cyt P450 et GST sont augmentées toutes deux d'un facteur 4. Les activités estérasiques augmentent d'un facteur moindre (x 1,3 à x 1,4) mais néanmoins significatif.

Dans tous les cas, on peut constater que la sélection se traduit par une augmentation supplémentaire des activités globales de détoxication par rapport à la pré-exposition courte.

Deux mécanismes bien différents interviennent dans la tolérance aux xénobiotiques végétaux : l'induction et la sélection paraissent jouer deux rôles complémentaires avec des actions additives dans la résistance larvaire aux xénobiotiques. Ces deux mécanismes, à court terme et à long terme, peuvent apparaître comme une adaptation aux différentes conditions rencontrées dans l'environnement (stress occasionnel ou continu). La résistance larvaire par sélection s'acquiert rapidement (à partir de la 7ème génération après le début de la sélection) et apparaît comme une voie forte, efficace et polyvalente pour augmenter la tolérance larvaire aux xénobiotiques environnementaux.

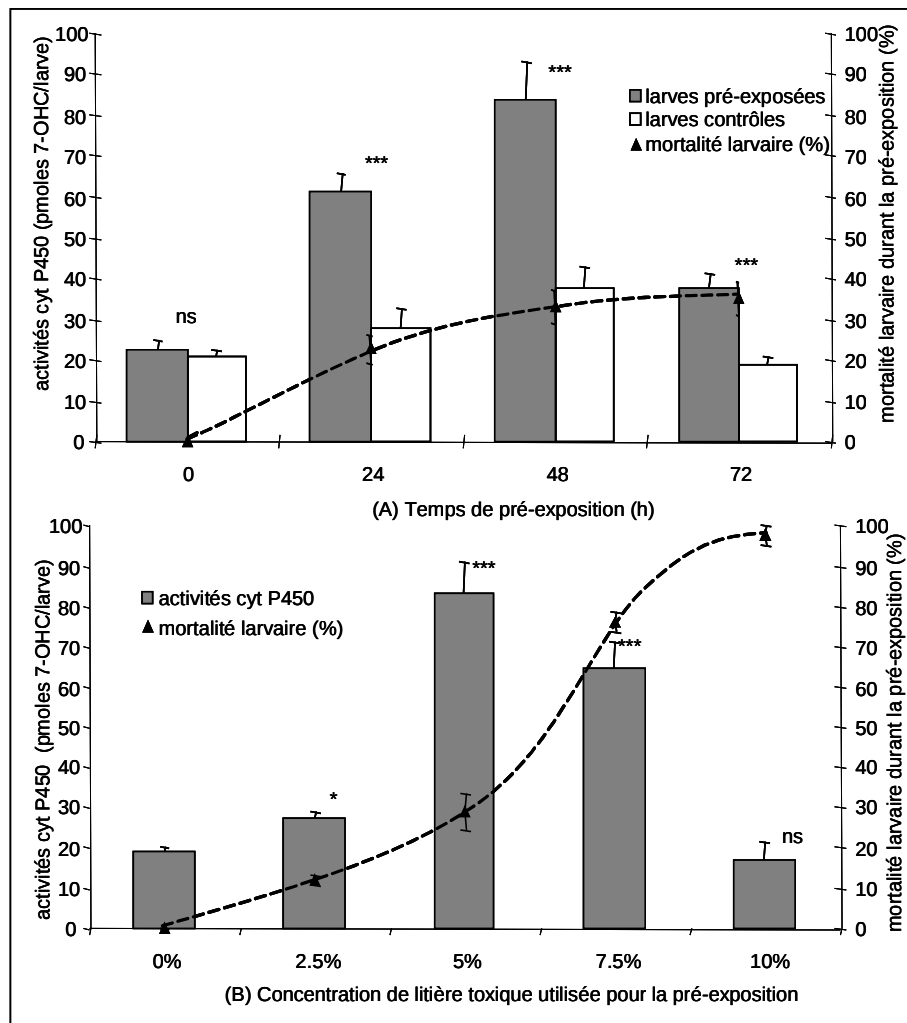


Figure 14. Effets du temps (A) et de la concentration (B) de pré-exposition à la litière toxique sur les activités cyt P450 et le taux de mortalité des larves d'*Aedes aegypti* à cette même litière toxique. Les différences des activités enzymatiques ont été analysées par un test de comparaison de moyenne (N=48 pour les cyt P450 ; ns, non significatif ; * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001).

L'augmentation de la tolérance larvaire et de l'activité globale des cyt P450 après pré-exposition à la litière toxique dépend à la fois du temps de pré-exposition et de la concentration en litière toxique (Figure 14). Le délai de 48h observé pour obtenir le maximum d'augmentation des activités cyt P450 est en accord avec les délais reportés dans d'autres études chez les insectes (Scott 1996; Stevens *et al.* 2000; Fisher *et al.* 2003). Bien qu'un effet positif de la relation dose-effet soit observé à faible dose de litière, entre la quantité de toxines ingérées et l'induction des enzymes cyt P450, ces mêmes activités diminuent pour de fortes pré-expositions à la litière toxique. Ce résultat peut signifier que les capacités enzymatiques sont saturées pour de fortes doses de xénobiotiques ingérés ayant pour conséquence un stress métabolique exprimé par une diminution des activités enzymatiques. Bien que notre étude supporte l'hypothèse de l'induction des activités enzymatiques de détoxification, la mortalité larvaire apparaissant durant la pré-exposition peut aussi participer pour une part à la sélection de certains phénotypes montrant une forte activité cyt P450 et une plus forte tolérance à la litière toxique. La comparaison entre la distribution des fréquences des activités cyt P450

révèle que 30% des activités cyt P450 sont plus fortes que la valeur maximale obtenue avec les larves non pré-exposées, indiquant une augmentation des activités plutôt due à l'induction.

Ainsi, après pré-exposition à une dose non létale de litière toxique ou après sélection par cette même litière, on observe pour une nouvelle exposition à la litière toxique, une corrélation entre la diminution de la mortalité et l'augmentation des activités enzymatiques de détoxification (estérases, monooxygénases à cytochrome P450 et glutathion-S-transférases), ce qui suggère que l'augmentation des activités dans ces trois familles d'enzymes contribuent à augmenter la tolérance des larves à la litière toxique. Nos mesures des activités estérases et cyt P450 sont en accord avec les résultats écotoxicologiques précédemment obtenus (David *et al.* 2000a) qui suggéraient une contribution possible de ces 2 familles enzymatiques dans le métabolisme de détoxification des xénobiotiques végétaux par les larves de moustiques détritivores. Nos résultats suggèrent en outre l'implication des GST dans la détoxification de la litière toxique par des larves de moustiques. Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres groupes d'insectes, comme par exemple le lépidoptère *Spodoptera frugiperda* (Yu 1999) chez lequel on observe une induction importante de glutathion-S-transférase en réponse à l'exposition à des xénobiotiques naturels.

B- Induction de gènes CYP par la litière toxique

La relation entre la tolérance larvaire d'*A. aegypti* à la litière toxique et les activités des monooxygénases à cytochrome P450 a ensuite été examinée au niveau moléculaire. Notre but était d'identifier des enzymes à P450 impliquées dans les augmentations d'activités métaboliques observées après traitement à la litière toxique. Le séquençage du génome d'*A. aegypti* n'étant pas disponible au moment de notre étude, nous avons utilisé des amorces dégénérées, afin d'amplifier des fragments de CYP appartenant aux principales familles classiquement liées aux phénomènes de détoxification (CYP4, CYP6, CYP9). Les niveaux d'expression de cyt P450 en absence ou présence de poudre toxique (5%) ont ensuite été étudiés après 48 heures d'exposition, afin d'identifier les gènes exprimés différemment. Puis nous nous sommes intéressés au profil d'expression tissulaire et au cours du développement d'un gène candidat.

I. Isolation de gènes CYP à partir de larves d'*A. aegypti*

Dans les enzymes à cytochrome P450, plusieurs régions sont fortement conservées, en particulier au sein d'une même famille. Les amorces dégénérées ont ainsi été choisies dans deux régions conservées permettant d'amplifier des fragments d'environ 500 pb (hélice I à région de liaison à l'hème) (Shen *et al.* 1993; Snyder et Glendinning 1996 ; David *et al.* 2003). Nous avons décidé de nous focaliser sur les familles microsomaes CYP4, CYP6 et CYP9 du fait de leur fréquente implication dans les processus de détoxification chez les insectes (Feyereisen 1999; Scott *et al.* 1998; Ranson *et al.* 2002).

Tableau 2. Caractéristiques des fragments de gènes codant pour des monooxygénases à cytochromes P450 isolés chez *A. aegypti*

Nom du gène	Longueur du fragment	Nombre d'allèles trouvés	Localisation dans le génôme		
			Supercontig	Brin	Région génomique
CYP4C38	450	1	1.673	plus	42367-42872
CYP4D23	456	3	1.283	moins	1222192-1222604
CYP4D24	456	1	1.283	moins	1360092-1360583
CYP4?	452	2	1.457	plus	137947-138429
CYP4H28	459	1	1.85	plus	2665785-2666291
CYP4H29	447	1	1.285	moins	382127-382543
CYP6M5	463	2	1.371	plus	485802-486297
CYP6M6	463	1	1.371	moins	471997-471938
CYP6N6	460	2	(-)	(-)	(-)
CYP6AL1	463	1	1.354	plus	547315-549015
CYP6AL2	454	2	1.1219	moins	100730-100300
CYP9J6	475	1	1.62	plus	2907858-2908299
CYP9J7	475	1	1.1188	moins	76370-76827
CYP9J8	475	1	1.221	plus	391756-392208
CYP9J9	474	3	1.221	plus	352992-353442
CYP9J10	474	2	1.221	plus	374522-374972

L'utilisation d'amorces dégénérées des familles de gènes *CYP4*, *CYP6* and *CYP9* nous a permis d'isoler 25 nouveaux fragments de 447 à 475 paires de base correspondant à 16 nouveaux gènes *CYP* d'*A. aegypti* (Tableau 2). Six *CYP4s*, 5 *CYP6s* et 5 *CYP9s* ont été détectés, dont 7 sous plusieurs formes alléliques. La comparaison des séquences protéiques de ces gènes avec d'autres gènes *CYP* a permis de les classer dans les sous-familles *CYP4C*, *CYP4D*, *CYP4H*, *CYP6M*, *CYP6AL* et *CYP9J* selon la nomenclature internationale des monooxygénases à cytochrome P450 (<http://drnelson.utmen.edu/cytochromeP450.htm>, (Nelson *et al.* 1996). La localisation génomique de ces gènes (génome 7.5x, Blastn, <http://www.broad.mit.edu/seq/msc/>) révèle que les gènes *CYP4D23/CYP4D24*, *CYP6M5/CYP6M6* et *CYP9J8/CYP9J9/CYP9J10* sont contigus et organisés en clusters, respectivement sur les supercontigs 1.283, 1.371 et 1.221. Cette organisation constitue un phénomène habituel pour les CYPs d'insectes et de moustiques en particulier.

Cependant, il faut noter que nous n'avons pas réussi à trouver le gène *CYP6N6* isolé dans notre étude dans les séquences du génome d'*A. aegypti*, ni dans aucune base de données de séquence EST. La comparaison des séquences traduites en acides aminés avec les séquences protéiques du moustique *Anopheles gambiae* (Blastx, <http://p450.antibes.inra.fr/>) révèle une forte homologie pour la plupart des gènes (62 % à 84 %). Cependant, on voit également apparaître une nouvelle sous-famille, *CYP6AL*, chez *A. aegypti*, qui ne semble pas présente chez *A. gambiae*.

II. Expression différentielle des gènes CYP après pré-exposition des larves à la litière toxique

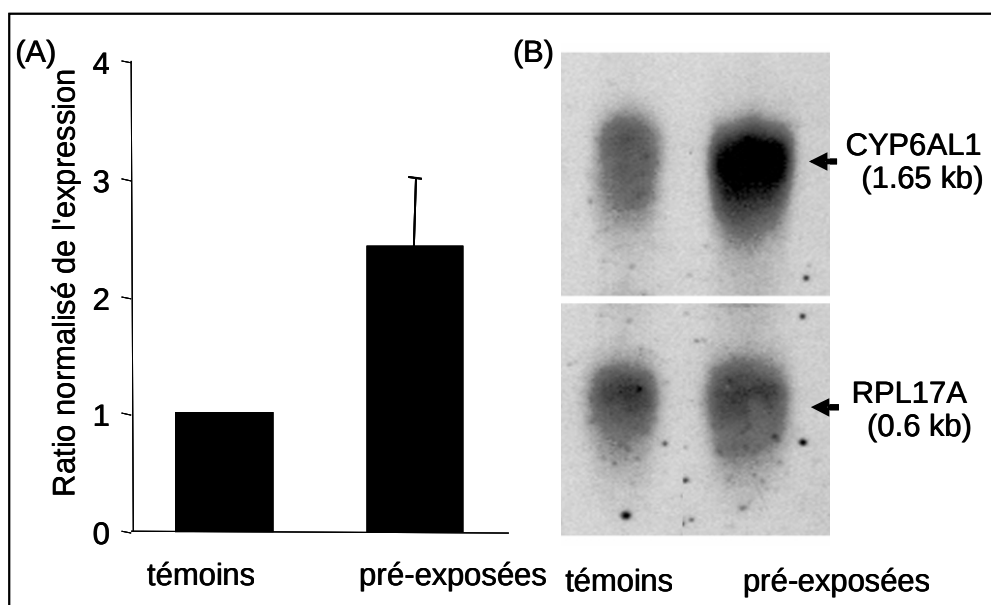


Figure 15. Analyse par northern blot de la variation d'expression du gène *CYP6AL1* après pré-exposition à la litière toxique (A) Analyse quantitative (N=3 expériences indépendantes) (B) Photo d'un développement de northern blot.

Parmi les 16 gènes analysés, seul le gène *CYP6AL1* révèle une différence d'expression significative chez les larves d'*A. aegypti* après pré-exposition avec de la nourriture contenant 5% de litière toxique pendant 48h (Figure 15). *CYP6AL1* présente une expression 2,3 fois plus forte chez les larves pré-exposées que chez les larves témoins.

III. Expression différentielle des gènes CYP aux différents stades de vie et dans différents organes

Les variations d'expression du gène *CYP6AL1* ont été étudiées aux différents stades de vie du moustique par RT-PCR semi-quantitative (Figure 16). Le stade adulte a été choisi comme référence pour la quantification (x 1). On observe une augmentation graduelle de l'expression de ce gène durant les différents stades larvaires de développement (x 0,1 ; x 0,3; x 0,7 ; et x 2,1 par rapport à l'expression chez l'adulte respectivement pour les stades 1, 2, 3 et 4). L'expression est maximale durant le stade nymphal (x 2,9 par rapport à l'expression chez l'adulte), c'est-à-dire 6 jours après l'éclosion des œufs, puis diminue chez l'adulte.

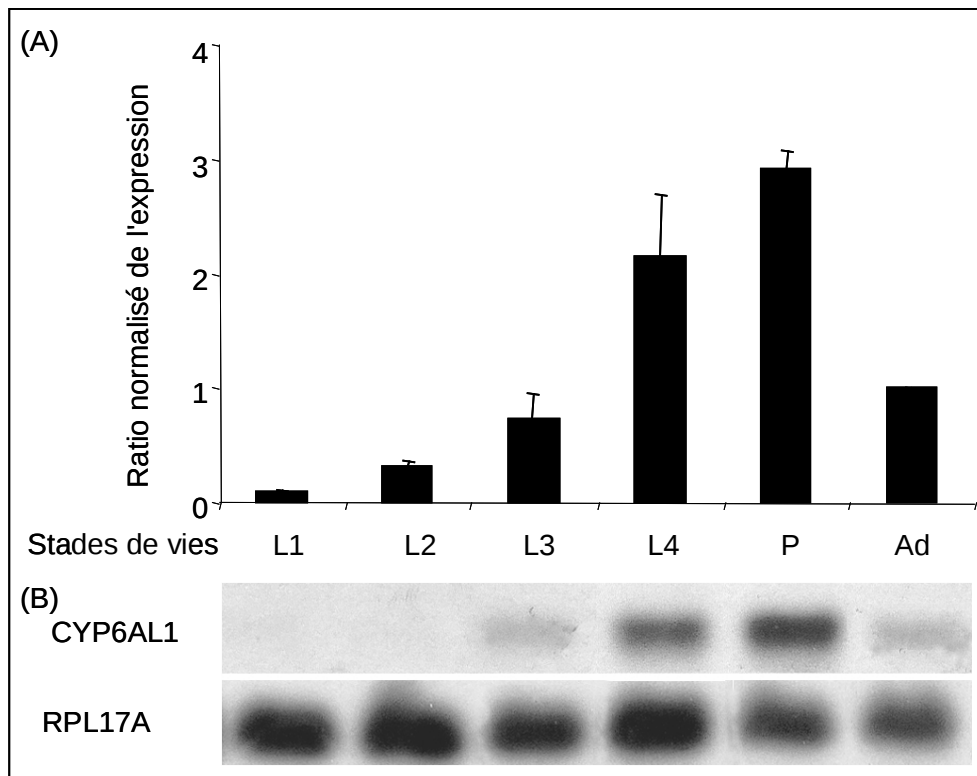


Figure 16. Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression du gène *CYP6AL1* aux différents stades de vie du moustique. L1, L2, L3, L4 représentent les 4 stades larvaires, P est la nymphe, Ad est l'adulte. (A) Analyse quantitative (n = 3 RT-PCR indépendantes) (B) Photo du développement d'un Southern blot

Nous avons décidé de préciser l'expression tissulaire de ce gène à un moment de forte expression (stade larvaire 4). Afin de pouvoir émettre des hypothèses quant au rôle de ce gène. L'analyse des résultats obtenus par RT-PCR sur les différents segments de larves de stade 4 nous a permis de détecter l'expression du gène *CYP6AL1* dans la tête et le thorax ainsi que dans l'abdomen. L'expression de *CYP6AL1* est également détecté dans la carcasse (correspondant en grande partie à l'épiderme), dans le tube digestif, le corps gras mais pas dans les tubes de Malpighi (système d'excrétion) ni dans le cerveau (Figure 17).

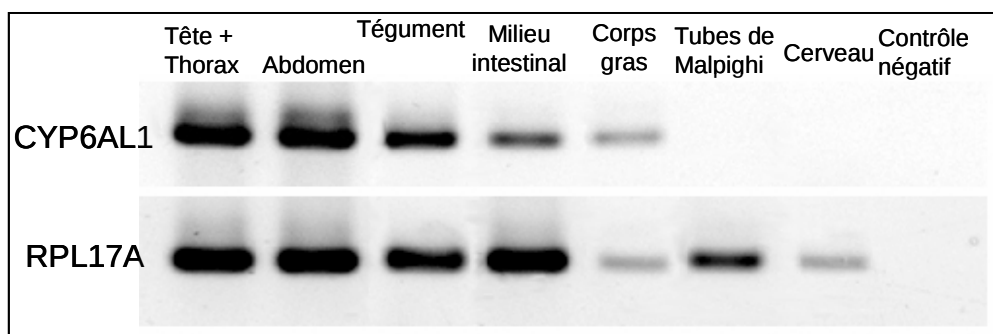


Figure 17. Analyse par RT-PCR de l'expression tissulaire de *CYP6AL1* dans les différents organes d'une larve L4 d'*A. aegypti*.

IV. Analyse de la séquence génomique du gène CYP6AL1



L'obtention de la séquence entière du gène *CYP6AL1* par criblage d'une banque génomique d'*A. aegypti* insérée dans des chromosomes artificiels de bactéries (BAC) et par séquençage partiel du clone positif (clone ND118, col 6 row L) incluant les séquences 5' et 3' nous a permis d'identifier et de cloner la totalité de la région codante de *CYP6AL1*. Ce gène sans intron code pour une protéine cyt P450 de 508 acides aminés (GenBank : no **AY771597** et Figure 18). La taille supposée du transcrit (1639 paires de base) est en accord avec la taille du transcrit unique détecté par northern blot (environ 1.65 kb). La comparaison de la protéine transcrite de *CYP6AL1* avec les protéines cyt P450 d'*A. gambiae* et de *Drosophila melanogaster* P450 (Blastp, <http://p450.antibes.inra.fr/>) révèle de forts degrés d'homologies avec les gènes *CYP6N*, *CYP6M*, *CYP6Z* et *CYP6Y* d'*A. gambiae* et les gènes *CYP6D* et *CYP6A* de *D. melanogaster*.

L'analyse de la région située en amont du premier codon (ATG) = +1 de *CYP6AL1* révèle une répétition possible de 2 sites consensus initiateurs de la transcription TCAGT aux emplacements -35 et -39. Le codon TCAGT (position -35) a été choisi comme le gène +1 d'annotation. Cette analyse a également révélé la présence d'un rétrotransposon (GenBank, répertorié **AF107693**) de la position -1060 à la position -385. Entre ce rétrotransposon et le site de début de transcription (-385 à +1), nous avons identifié plusieurs sites possibles de liaison à des facteurs de transcription comme une TATA-Box (position -72), une CAAT-Box (position -158) et une courte séquence semblable à des éléments de régulation Oct (octamère, position -29). La présence d'une séquence nucléotidique courte et hautement similaire à un élément *Oct* régulateur de la transcription, précédemment trouvé et associé à d'autres *CYP6B* chez les insectes herbivores (McDonnell *et al.* 2004), et avec *CYP2Ds* chez les mammifères (Mizuno *et al.* 2003), confirme que le gène *CYP6AL1* peut effectivement avoir un rôle dans la réponse à l'exposition à des xénobiotiques.

Les 16 fragments de gènes isolés ne représentent bien sûr pas l'ensemble des *CYP4*, 6 et 9 d'*A. aegypti*. En effet, si on compare avec les données des génomes d'anophèle ou de drosophile, on peut s'attendre à une trentaine de *CYP4s* et *CYP6s* ainsi qu'à une dizaine de *CYP9s*. Cependant, on peut penser que les fragments isolés représentent des gènes dont l'expression est importante et l'utilisation de larves pré-exposées pour l'isolement des ARNm peut augmenter la probabilité d'isoler des gènes *CYPs* liés à la réponse des larves aux toxines de la litière végétale (Scharf *et al.* 2001). *CYP6AL1* a effectivement été isolé à partir des larves pré-exposées et non des larves témoins. La surexpression de ce gène est en accord avec des valeurs d'inductions de gènes *CYP* observées chez d'autres insectes après ingestion de toxines végétales (Hung *et al.* 1995; Ranasinghe et Hobbs 1999). Les gènes *CYPs* sont souvent induits par leur propre substrat (Feyereisen 1999; Scott 1999) et l'induction du gène *CYP6AL1* par la litière toxique pourrait indiquer son rôle potentiel dans la détoxification des toxines végétales. Cette hypothèse est renforcée par son expression dans le tube digestif et le corps gras chez la larve, deux tissus fréquemment associés à l'expression de gènes *CYPs* liés à la détoxification de xénobiotiques chez les insectes (Li *et al.* 2002; Stevens *et al.* 2000; Petersen *et al.* 2001). En outre d'autres gènes *CYPs* ont actuellement été impliqués dans la tolérance aux insecticides tels que *CYP6Zs* chez *An. gambiae* (Nikou *et al.* 2003) et *CYP6Ds* chez *Musca domestica* (Kasai et Scott 2000).

C- Plasticité fonctionnelle et Résistances multiples

Nous proposons de définir la plasticité fonctionnelle des enzymes de détoxification comme la capacité à augmenter la tolérance larvaire soit par une induction des enzymes de détoxification après une pré-exposition à des concentrations non létales de xénobiotique(s), soit par un possible effet sélectif (surexpression constitutive) de la litière toxique sur les enzymes.

Dans le cadre d'une recherche de plasticité fonctionnelle et de résistance multiple, notre objectif a été d'établir si des populations de moustique exposées à un xénobiotique et devenant tolérantes à ce dernier pouvaient aussi acquérir une tolérance vis-à-vis d'autres xénobiotiques eux-mêmes insecticides. Cette plasticité fonctionnelle possible des enzymes de détoxification des larves d'*A. aegypti* a été recherchée par des mesures de mortalité et d'activités d'enzymes de détoxification :

- sur le court terme avec l'étude d'une augmentation possible des mécanismes de détoxification liés à une pré-exposition à des concentrations non létales de téméphos, de *Bti* et de litière toxique, et,
- sur le long terme, par l'étude d'un effet amplificateur possible de l'exposition à la litière toxique sur le potentiel de détoxification constitutif.

Dans un premier temps, nous avons recherché le potentiel d'induction du téméphos, du *Bti* et de la litière toxique sur les mécanismes de détoxification. Pour cela, des échantillons homogènes de larves (100 larves de stade 4) ont été exposés 24 et 48 heures à différentes concentrations et produits (téméphos à 0,1 et 0,05 µg/L, *Bti* à 0,05 et 0,025 mg/L et litière toxique à 1% en mélange avec de la nourriture d'élevage). Ces concentrations et les temps de pré-expositions ont été choisis après avoir vérifié que les conditions expérimentales n'étaient pas létales pour les larves.

Pour chaque mesure de mortalité (Les pourcentages de mortalité des larves obtenues après les pré-expositions sont comparées avec 3 insecticides (bioessais avec le téméphos, le *Bti* et la litière toxique) à 3 concentrations différentes pour chaque insecticide ($C_3 = 2 \times C_2$; $C_2 = 2 \times C_1$) avec 3 temps de bioessais (5h, 24h, 48h).

Tableau 3. Analyse de la variance des effets des différentes populations pré-exposées et non pré-exposée (=témoins), du temps et des concentrations de bioessais sur la mortalité larvaire des larves d'*A.aegypti*

	df	Bioessais avec le <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>		Bioessais avec le temephos		Bioessais avec la poudre de litière toxique	
		F	p	F	p	F	p
Temps de Bioessais x	2						
Concentration de Bioessais x	4	2.704	0.000 (***)	5.488	0.000(***)	0.431	0.000 (***)
Populations pré-exposées ou non							

L'analyse de l'effet des traitements (2 concentrations et 3 temps de bioessais) sur la tolérance larvaire à chacun des xénobiotiques révèle des différences significatives de tolérance parmi les 7 échantillons étudiés (Tableau 3). Le test de Tukey nous a permis d'affiner notre analyse et de détecter les plus tolérants des échantillons, comme les plus sensibles (Tableau 4).

Tableau 4. Populations significativement les plus sensibles et les plus tolérantes aux 3 insecticides en fonction des traitements. Le traitement des données a été réalisé avec un test de Tukey b (N=64, p=0.05).

Insecticide testé	Populations les plus tolérantes	Populations les moins tolérantes
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	sélection à la poudre de litière toxique induit avec 0.025 mg/L de Bti	induits avec 0.1 µg/L de téméphos non induits
téméphos	sélection à la poudre de litière toxique induit avec 0.025 mg/L de Bti induit avec 0.050 mg/L de Bti induit avec la poudre de litière toxique	non induits induits avec 0.1 µg/L de téméphos induits avec 0.05 µg/L de téméphos
Litière toxique	induits avec 0.025 mg/L de Bti induits avec la poudre de litière toxique	non induits induits avec 0.1 µg/L de téméphos induits avec 0.05 µg/L de téméphos

- Une plus forte tolérance au *Bti* a été observée chez les larves induites au *Bti* et à la litière et chez les larves sélectionnées, alors que les larves sans traitement (= témoins) et les larves induites au téméphos montrent des tolérances plus faibles au *Bti*.
- Une plus forte tolérance au téméphos a été observée chez les larves induites au *Bti* et à la litière toxique ainsi que chez les larves sélectionnées, alors que les larves sans traitement et les larves induites au téméphos montrent des tolérances plus faibles au téméphos.
- Une plus forte tolérance à la litière toxique a été observée chez les larves induites au *Bti* et chez les larves sélectionnées à la litière toxique, alors que les larves sans traitements (= témoins) et les larves induites au téméphos montrent des tolérances plus faibles à la litière toxique.

Cette première partie d'étude a donc permis de mettre en évidence que l'induction à la litière toxique entraîne une résistance à elle-même. Il existe de la même façon une plus grande tolérance au *Bti* lorsque les larves sont induites au *Bti*. Ces deux résultats mettent en avant le rôle de l'induction dans la résistance des larves. Mais nous avons également montré qu'il existe un phénomène de résistance croisée entre les trois toxiques (*Bti*, téméphos, et litière toxique) après induction. Les résultats obtenus montrent que cette sensibilité est influencée par la concentration et le type du xénobiotique inducteur.

L'induction paraît donc jouer un rôle important dans la tolérance larvaire aux xénobiotiques environnementaux. D'un point de vue appliqué, les résultats obtenus suggèrent que l'utilisation continue du *Bti* pourrait conduire à une augmentation de la résistance des

larves quel que soit le larvicide. L'utilisation de cet insecticide pourrait donc contribuer à pré-adapter les larves de moustiques à résister à d'autres xénobiotiques.

Cette résistance croisée a ainsi une implication écotoxicologique : la tolérance larvaire aux xénobiotiques environnementaux que l'on peut rencontrer dans l'eau va déterminer les capacités adaptatives des populations de moustiques. Ainsi, la polyvalence et la complémentarité de l'équipement enzymatique impliqué dans ces processus de détoxification apparaît être comme une clé de la plasticité adaptative des populations de moustiques.

Les échantillons induits au téméphos présentent des valeurs de tolérance et d'activités enzymatiques dignes de ceux obtenus avec les larves non-induites. La pré-exposition avec du téméphos ne montre aucun effet positif sur la tolérance aux différents toxiques. Ceci est peut-être dû à l'utilisation d'une concentration excessive de téméphos durant la phase d'induction, conduisant à des larves seulement survivantes présentant des activités physiologiques faibles. Ou bien c'est que le téméphos n'entraîne aucune induction.

En parallèle des mesures de mortalité, nous avons mesuré les activités enzymatiques de détoxification de chacun de nos échantillons afin de déterminer s'il existait des différences dues aux différentes pré-expositions. Nos résultats ont indiqué des différences significatives d'activités enzymatiques.

Tableau 5. Populations avec les activités enzymatiques significativement ($p = 0.05$) les plus élevées et les plus faibles en fonction des traitements

Famille enzymatique testée	Populations avec les plus fortes activités	Populations avec les plus faibles activités
Cytochrome P450	sélection à la litière toxique induit avec 0,025 mg/L de <i>Bti</i>	induits avec la litière toxique non induits
GST	induit avec 0,025 mg/L de <i>Bti</i>	non significatif
Esterases α	sélection à la litière toxique	non induits
Esterases β	sélection à la litière toxique induits avec la litière toxique	non significatif

L'analyse des activités enzymatiques de détoxification nous révèle des différences significatives parmi les 7 échantillons analysés (Tableau 5). La comparaison des activités enzymatiques de détoxification révèle des différences significatives dépendant du type de traitement. Les plus fortes activités de cyt P450 sont trouvées chez les larves sélectionnées, et chez les larves induites à 0,025 mg/L de *Bti*. Les activités GST sont également les plus fortes chez les larves induites à 0,025 mg/L de *Bti*, comparativement aux autres traitements et aux témoins. Enfin, les activités estérasiqes les plus fortes sont observées pour les larves sélectionnées avec la litière (α -estérase) et chez les larves sélectionnées et induites à la litière (β -estérases).

Les larves avec les plus fortes activités enzymatiques semblent également être les plus tolérantes. Les plus fortes activités de cyt P450 et β -estérases sont trouvées chez les larves sélectionnées, et cet échantillon est le plus tolérant au *Bti* et au téméphos. La même comparaison pourrait être faite entre les activités enzymatiques cyt P450 et GST chez les larves induites à 0,025 mg/L de *Bti* et leurs tolérances aux toxiques. Les larves les plus sensibles présentent également les activités enzymatiques les plus faibles. Ces résultats nous donnent une base pour comparer les effets toxicologiques et enzymologiques, suggérant une plasticité fonctionnelle des larves aux trois toxiques testés.

Nos résultats montrent la complexité des mécanismes d'induction. L'induction est influencée par les temps et les concentrations de pré-exposition ainsi que par le type de molécule choisi comme inducteur. Des effets différents sont également observés sur la résistance larvaire selon l'échantillon considéré. L'induction semble augmenter de manière plus importante les activités des cytochromes P450 et des GST, résultat peu surprenant compte tenu de l'abondante littérature qui indique les capacités de détoxification de ces 2 familles d'enzymes de détoxification (Cohen *et al.* 1989; Yu 1999; Hemingway *et al.* 2004).

La comparaison des tableaux 4 et 5 met en évidence les différences existant au sein d'un même ensemble de larves, soit au niveau de la résistance larvaire, soit au niveau de leurs activités enzymatiques. Les larves montrant les plus fortes activités enzymatiques (sélection à la litière toxique, pré-exposées soit à la litière toxique, soit au *Bti*) présentent également les meilleures résistances vis-à-vis des 3 insecticides. De plus, les lots sélectionnés et induits à la litière toxique apparaissent les plus résistants aux trois insecticides testés. Ces résultats suggèrent l'existence potentielle d'une résistance multiple.

Les populations d'insectes montrent généralement des aptitudes de résistance aux toxiques synthétiques ou naturels différentes suivant les gîtes de provenance. Cette résistance semble en relation très étroite avec 3 familles enzymatiques (cyt P450, GST, estérases), induites ou constitutives. Les différents niveaux de résistance larvaire aux trois produits toxiques indiquent que les produits chimiques présents dans l'environnement pourraient induire non seulement une résistance larvaire directe, mais également interagir avec d'autres molécules issues de l'environnement, et développer ainsi des processus de résistance croisée (Jin-Clark *et al.* 2002). Une plasticité fonctionnelle a été observée sur ces activités de détoxification qui apparaît comme une adaptation dynamique liée à la présence de xénobiotiques dans l'environnement.

D- Conclusion

Les résultats obtenus concernant l'acquisition d'une tolérance larvaire aux xénobiotiques étudiés semblent démontrer que l'étape de pré-exposition conduit à une induction d'enzymes de détoxification expliquant une certaine tolérance. Avec les mêmes xénobiotiques, l'acquisition d'une tolérance par un processus de sélection apparaît plus efficace compte tenu de l'émergence de lignées larvaires à très fort potentiel de détoxification. Enfin, nous observons qu'en sélectionnant des lignées larvaires grâce à la litière toxique, nous obtenons non seulement des organismes tolérants de fortes quantités de litière toxique, mais aussi tolérants le *Bti* et le téméphos.

L'ensemble des résultats obtenus en laboratoire nous conduit à nous interroger sur le devenir et l'évolution de souches sauvages de moustiques. En effet, l'induction et/ou la sélection des mécanismes de détoxification déclenchés par des insecticides présents à des doses non létales laissent supposer que dans les zones humides réceptrices d'agents exogènes (xénobiotiques naturels, pesticides et leurs métabolites, HAP, métaux lourds...) une telle situation est envisageable. A des concentrations basses un insecticide peut potentiellement 1) induire ou sélectionner des lignées larvaires tolérantes, ou 2) induire des résistances croisées. A notre sens, rien ne s'oppose non plus à ce qu'un xénobiotique non insecticide se trouve en situation d'induire ou de sélectionner des mécanismes de détoxification conduisant à terme à une tolérance à un ou plusieurs insecticides naturels ou de synthèse.

Pour tenter de répondre aux conséquences, sur la tolérance larvaire aux insecticides, de la présence de xénobiotiques divers dans les zones humides nous avons conduit sur des souches sauvages de moustiques (*O. cataphylla* et *A. rusticus*) le même type d'expérimentations que celles décrites avec *A. aegypti*.

Chapitre 4 : Impact des facteurs

environnementaux sur la tolérance

aux insecticides

Notre travail présenté dans le chapitre précédent de ce manuscrit avait pour objet d'établir les éventuelles relations entre l'aptitude d'une espèce de moustique modèle de laboratoire à tolérer certains insecticides et l'incidence, pour cette espèce, d'être au préalable pré-exposée et/ou sélectionnée par des xénobiotiques.

Ayant démontré, en conditions de laboratoire, qu'une pré-exposition et/ou sélection étaient associées à une modification des capacités métaboliques détoxifiantes, il nous restait à établir si, *in natura*, en fonction des niveaux de pollution chimique diffuse atteints dans l'environnement, de tels phénomènes pouvaient apparaître et être à l'origine de l'émergence de souches sauvages résistantes aux traitements insecticides classiquement utilisés par les gestionnaires des zones humides.

Dans cette partie éco-toxicologique liée aux conditions de terrain, nous avons privilégié trois axes d'études :

- 1- L'historique des traitements sur le terrain a-t-il sélectionné des lignées tolérantes sur une espèce, *Ochlerotatus cataphylla*, bien représentée en Rhône-Alpes ?
- 2- Face à une utilisation classique et répétitive du traitement *Bti* depuis 20 ans environ, peut-on s'attendre à trouver dans les populations sauvages des lignées résistantes à ce bio-insecticide ?
- 3- Un contact dans la nature avec des xénobiotiques autres que des insecticides peut-il être à l'origine d'une résistance insecticide ?

A - Mise en évidence d'une sensibilité différente à deux insecticides

sur des populations sauvages d'O. cataphylla

Le rôle des enzymes de détoxification dans les processus de tolérance aux produits chimiques, en particulier leur implication dans la résistance aux insecticides, est un point clé de plusieurs études essayant de répondre à des questions éco-toxicologiques. Dans ce travail, 4 populations d'une espèce locale de moustique (*Ochlerotatus cataphylla*) ont été prélevées sur 4 sites de la région Rhône-Alpes (France), et leur sensibilité respective à 2 insecticides utilisés sur le terrain (téméphos et *Bti*) a été testée.

Cette étude s'intéresse particulièrement aux relations entre niveaux d'activités enzymatiques de détoxication et mortalité de ces populations soumises à 2 insecticides. Le principal objectif est de déterminer s'il existe des relations spécifiques entre les sensibilités aux différents insecticides et les niveaux d'activités enzymatiques détoxifiantes au sein d'une même espèce.

I. Différences de sensibilité au téméphos et au Bti

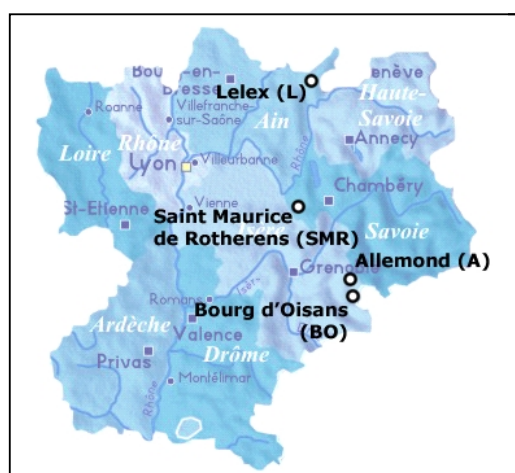


Figure 19. Localisation des 4 sites d'échantillonnage d'*O. cataphylla* en Rhône-Alpes. Tous les sites sont des gîtes à végétation arborescente

Nous avons échantillonné 4 populations d'*O. cataphylla* sur le terrain (Figure 19). Ensuite nous avons effectué les tests de mortalité à chaque insecticide au laboratoire. Le test ANOVA réalisé sur notre matrice de données révèle des différences de sensibilité à la fois au *Bti* et au téméphos dans les 4 populations d'*O. cataphylla* échantillonnées (Tableau 6).

Tableau 6. Analyse de la variance de la mortalité larvaire au *Bti* et au téméphos parmi les populations d'*O. cataphylla*. Les bioessais ont été réalisés en triplicata à 2, 4, 6 et 8 heures sur chacune des populations échantillonnées. Les résultats grisés correspondent aux concentrations sélectionnées pour les tests de régression (réalisés plus loin dans ce travail).

Durée des bioessais (h)	Insecticide					
	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>			téméphos		
	0,3 mg/L	0,6 mg/L	1,2 mg/L	0,0036 mg/L	0,0072 mg/L	0,0144 mg/L
2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
4	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	*
6	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	*
8	*	*	*	*	n.s.	*

Lors des bioessais, ces différences sont significatives pour les temps de contact les plus élevés (8h) et aux concentrations d'insecticides les plus fortes (1,2 mg/L pour le *Bti* et 0,0144 mg/L pour le téméphos). Le test de Tukey-b, sur ces données de mortalité, nous permet de classer les 4 populations suivant leur sensibilité à chacun des insecticides (Figure 20). A des temps de contact et à des concentrations plus faibles, les taux de mortalité sont faibles dans les 4 populations et ne montrent pas de différences significatives entre elles.

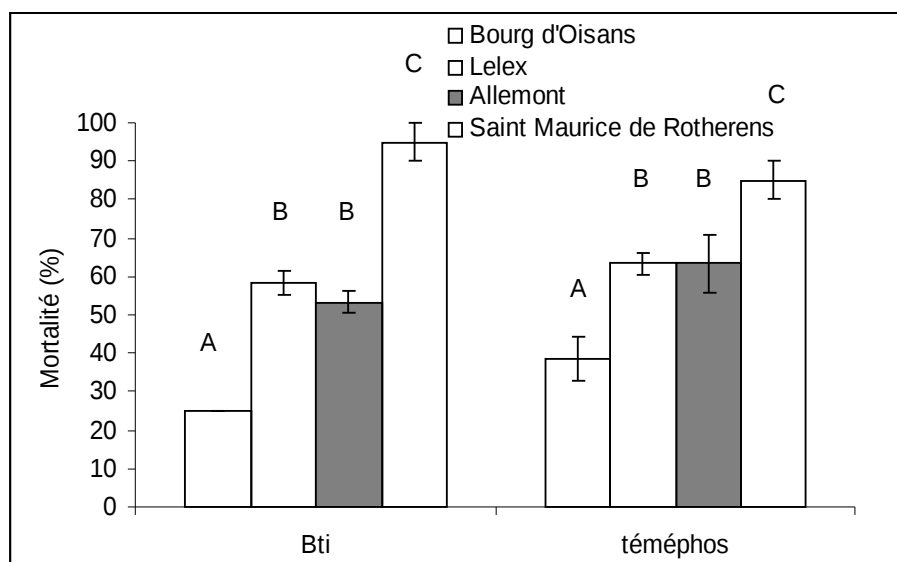


Figure 20. Mortalité larvaire des différentes populations d'*O. cataphylla* après 8h au *Bti* (1,2 mg/L) et au téméphos (0,0144 mg/L). Les lettres A, B, C signifient que les valeurs sont statistiquement différentes à $p = 0,05$.

La population collectée à Bourg d'Oisans apparaît la moins sensible à la fois au *Bti* et au téméphos, alors que celle issue de Saint Maurice de Rotherens est la plus sensible aux 2 insecticides. Entre ces 2 populations, les populations collectées à Lelex et Allemont montrent des sensibilités intermédiaires et voisines quelque soit l'insecticide.

Ainsi, des différences de sensibilité aux insecticides doivent exister dans les populations sauvages d'une même espèce. Cette possibilité avait déjà été décrite (Robertson *et al.* 1995) et en particulier démontrée avec le téméphos sur une population de *Culex pipiens* en Tunisie (Cheikh et Pasteur 1993). Dans notre étude, nous avons aussi observé des différences significatives de sensibilité au *Bti* entre les populations échantillonnées. Des différences de sensibilités au *Bti* ont été décrites récemment chez des populations de terrain d'*Anopheles sinensis* en Chine (Zhang *et al.* 2004). Ces auteurs émettent l'hypothèse d'une perte de sensibilité des larves au *Bti* liée à l'emploi du traitement *Bti*.

En Rhône-Alpes, des années 1970 à 1990, le contrôle des larves de moustiques s'effectue grâce au téméphos. A partir de 1990, il est remplacé par le *Bti*, toujours utilisé comme unique traitement. Nous avons, grâce à l'EID, reconstitué l'historique des traitements sur les 4 sites choisis pour nos captures. Nous pouvons classer les 4 sites choisis en 3 groupes :

- 1- Un site jamais traité (Saint Maurice de Rotherens)
- 2- Un site traité depuis l'origine des traitements effectués par l'EID, ayant connu les traitements téméphos puis *Bti* (Bourg d'Oisans).
- 3- Deux sites traités seulement avec du *Bti* depuis 15 ans (Lelex et Allemont)

Une relation entre historique de traitement et perte de sensibilité aux traitements apparaît : la population originaire du site le plus anciennement traité est la population devenue la moins sensible aux 2 insecticides, et celle originaire du seul site non traité est la plus sensible des 4. Les 2 populations intermédiaires en termes de sensibilité sont également celles qui connaissent un historique de traitement insecticide intermédiaire.

Nos résultats confortent donc l'hypothèse d'une relation entre la sensibilité aux insecticides des populations sauvages et l'historique des traitements insecticides auxquels elles ont été exposées. Comme dans le cas d'*An. sinensis* en Chine, cette hypothèse pourrait permettre d'expliquer la différence de sensibilité d'*O. cataphylla* au *Bti*. De telles différences de sensibilité en relation avec une exposition à un insecticide peuvent être considérées comme une première étape d'acquisition d'une résistance au *Bti* des populations de moustique en région Rhône-Alpes.

II. Relations entre les niveaux d'activités enzymatiques de détoxification et sensibilité des larves au téméphos et au Bti

Un test ANOVA effectué sur les mesures d'activités enzymatiques nous indique des différences significatives fortes entre les populations, indépendamment de la classe d'enzyme considérée (Figure 21). Nos résultats montrent que les 4 populations de terrain appartenant à la même espèce ont des sensibilités différentes au *Bti* et au téméphos, probablement reliées à des niveaux d'activités enzymatiques différents.

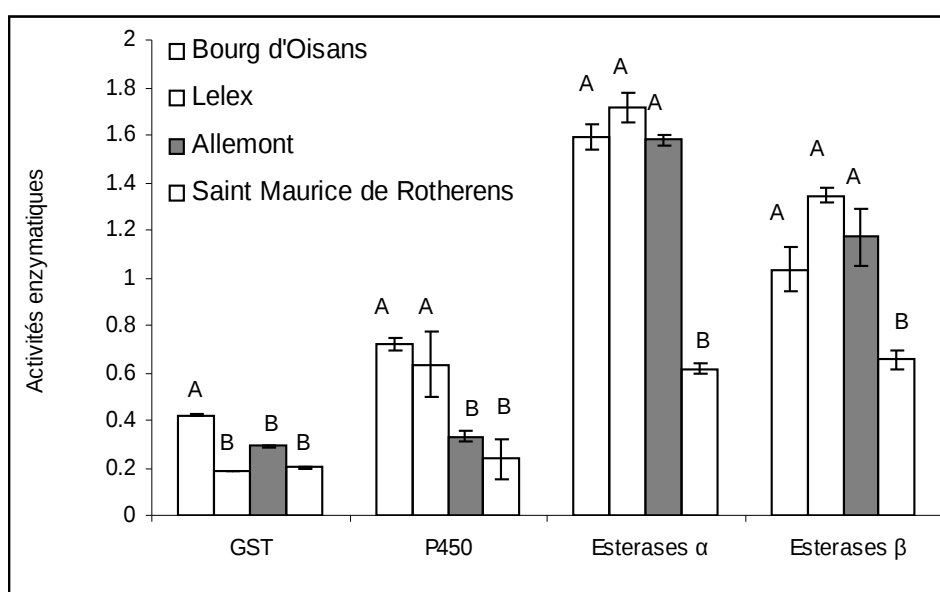


Figure 21. Comparaisons des moyennes des niveaux d'activités enzymatiques mesurés dans les différentes populations d'*O. cataphylla*. Les lettres A, B signifient que les valeurs sont statistiquement différentes à $p = 0,05$. Les niveaux d'activités sont exprimés en pmoles de conjugués/ μ g protéine/min pour les GST, en 10 pmoles de 7-OHC/larve/min pour les cyt P450 et en pmoles d' α ou β naphthol/ μ g protéine pour les estérases.

L'ordre de classement des populations en termes d'activités enzymatiques de détoxification est l'inverse de celui des sensibilités aux insecticides. La population originaire de Bourg d'Oisans est la population possédant toujours les plus fortes activités enzymatiques, et inversement, la population collectée à Saint Maurice de Rotherens possède les plus faibles activités enzymatiques. Dans le but de tester la relation entre sensibilité et activité enzymatique, des tests de régression linéaire sont réalisés. Ces tests vont nous permettre de savoir si les niveaux d'activités enzymatiques, pris un à un, sont des variables explicatives des différences de mortalité à chacun des 2 insecticides testés.

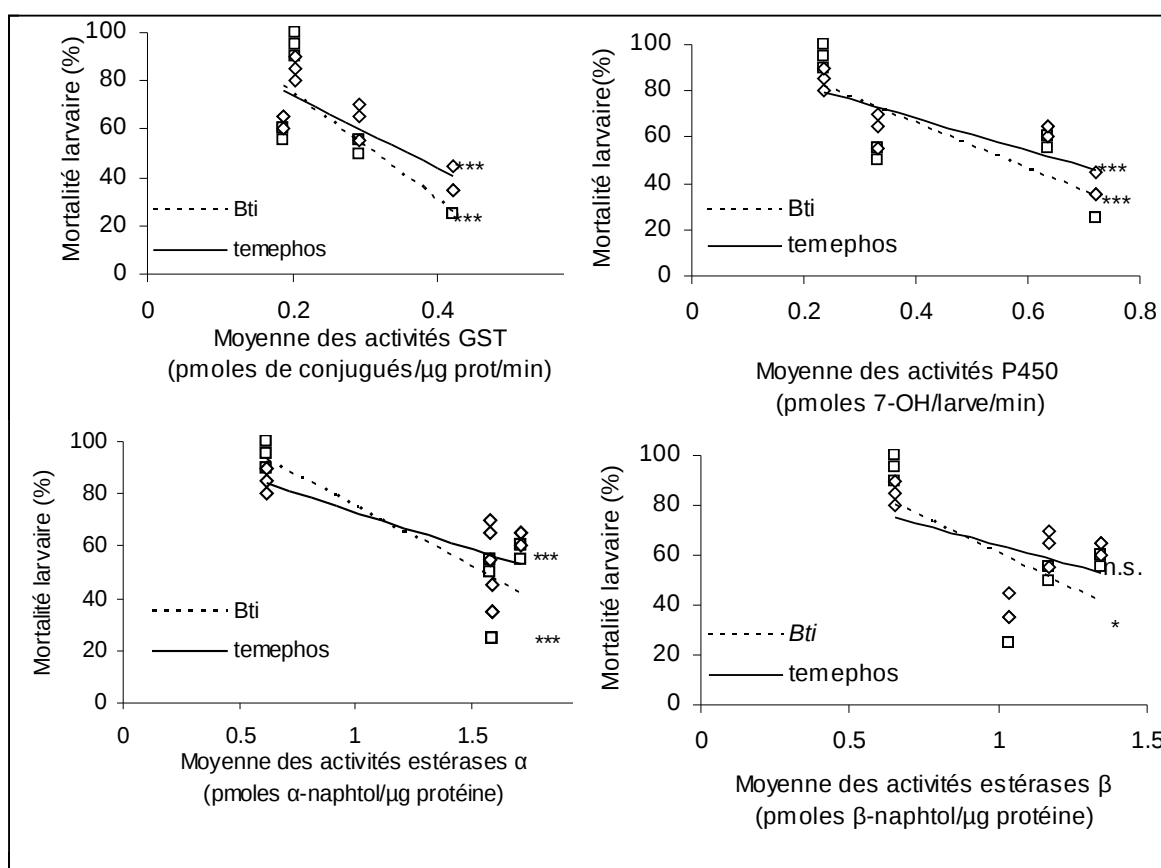


Figure 22. Corrélations entre les taux de mortalité des larves d'*O. cataphylla* au *Bti* (8 h à 1,2 mg/L : □) et au téméphos (8 h à 0,0144 mg/L : ■) et les moyennes de leurs activités enzymatiques de détoxification (glutathion-S-transférases (GST), cytochrome P450, α- and β-estérases). Le seuil choisi des corrélations est $p = 0,05$.

Des corrélations négatives entre les activités des enzymes de détoxification et le taux de mortalité larvaire apparaissent pour les 2 insecticides (Figure 22). Quelque soit l'enzyme considérée, les populations les moins sensibles possèdent les plus fortes activités enzymatiques. Ces corrélations apparaissent hautement significatives ($p < 0,001$), sauf pour les activités β-estérases qui n'apparaissent pas significativement corrélées à la sensibilité au téméphos.

Le test de la régression linéaire multiple, réalisé sur l'ensemble des données nous permet de rechercher les variables qui expliquent le mieux les différences de tolérance aux 2 insecticides. Ce test réalisé avec les 4 enzymes donne le résultat suivant : pour les sensibilités au *Bti* et au téméphos, les variables les plus explicatives apparaissent être les GST et les α-

estérases, dans l'ordre (Tableau 7). Ce résultat met en évidence une plus grande contribution de ces deux enzymes aux sensibilités larvaires des populations échantillonnées dans notre étude, mais ne doit pas occulter l'implication des cyt P450 mise en évidence plus haut.

Tableau 7. Régressions linéaires multiples des niveaux d'activités enzymatiques (cyt P450, GST, estérases α et β) sur les mortalités larvaires au *Bti* (8h à 1,2 mg/L) et au téméphos (8h à 0,0144 mg/L). D.L. degré de liberté, D.N. déviance nulle, D.R. déviance résiduelle.

Insecticides	D.L. total	D.L. résiduel	D.N.	D.R.	Variables	Coefficients
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	23	21	1488	447		
			0	4	Constante	123.68
					Cytochrome P450	
					GST	-51.48
					Estérases α	-38.80
					Estérases β	
téméphos	23	21		267		
			6550	4	Constante	102.61
					Cytochrome P450	
					GST	-33.73
					Estérases α	-22.90
					Estérases β	

L'hydroxylation par les monooxygénases à cytochrome P450 durant la phase I de détoxification est l'étape préparant la réaction de conjugaison (phase II) impliquant les GST (Yu 2002). Ces 2 enzymes sont connues pour fonctionner ensemble dans les processus de détoxification de nombreux substrats, comme les insecticides organophosphorés (Hemingway *et al.* 2004). Mais nos résultats montrent que ces enzymes sont aussi reliées à une différence de mortalité au *Bti*. Compte tenu du mode d'action de cet insecticide qui nécessite la reconnaissance de la toxine par récepteur spécifique dans les cellules épithéliales de l'intestin, il reste à savoir si un tel composé peut être rendu inefficace par des cyt P450 ou des GSTs.

En ce qui concerne les estérases, leur implication dans de nombreux cas de résistance aux insecticides a été largement démontrée (Walker et Mackness 1983; Hemingway 2000). Elles peuvent contribuer à la détoxification des organophosphorés chez les larves de moustiques (Raymond *et al.* 1998). Par contre, peu de connaissances existent sur leur possible implication dans la détoxification des cristaux protéiques, tels ceux présents dans le bactério-insecticide *Bti*. Démontrer l'implication de telles enzymes dans la sensibilité différentielle des larves de moustiques au *Bti* serait un résultat nouveau et important car, jusqu'à aujourd'hui, la seule résistance acquise au *Bacillus thuringiensis* connue est le résultat d'une mutation sur un gène codant pour un récepteur d'un cristal protéique (Tabashnik 1997).

Le résultat le plus intéressant de notre travail est la mise en évidence de différences de sensibilité des populations sauvages d'une même espèce de moustique, associées à des niveaux d'activités enzymatiques de détoxification connues pour leur implication dans la résistance à d'autres insecticides. Cette observation est concordante avec l'idée qu'un xénobiotique peut induire une tolérance directe contre son propre mode d'action (Yu 1986),

mais aussi générer des processus de résistances multiples par stimulation des mêmes enzymes de détoxification (Horowitz et Denholm 2000).

B - Un traitement répété au Bti peut-il créer des conditions

d'émergence de lignées résistantes à cette toxine ?

Cinquante années de traitement par des pesticides ont conduit à l'apparition d'organismes résistants à ces produits. Dans le cas des insecticides de synthèse, des phénomènes de résistance ont été observés aussi bien en laboratoire que sur le terrain (Ishaaya 2001). Dans ces conditions nous nous sommes posé la question de savoir si un traitement *Bti* pouvait être à l'origine d'un processus de tolérance à ce bio-insecticide. Dans l'étude, nous avons 1) comparé la tolérance au *Bti* de plusieurs populations sauvages d'une espèce présente en Rhône-Alpes et 2) tenté de comprendre s'il y avait une relation entre apparition de tolérance et historique des traitements par le *Bti*.

I. Echantillonnage

Nous avons prélevé sur différents sites une espèce présente en Rhône-Alpes, *Aedes rusticus*, afin de comparer leur sensibilité au *Bti*.

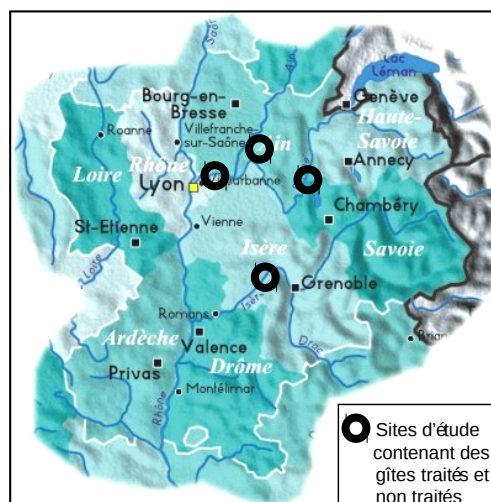


Figure 23. Localisation des 4 sites d'échantillonnage d'*Aedes rusticus* en Rhône-Alpes.

Les gîtes larvaires à *Aedes rusticus* échantillonnés se situent en Isère et en Savoie (Rhône-Alpes, France) et ont été choisis avec l'aide de l'E.I.D (Figure 23). Nous avons ainsi choisi 4 sites éloignés les uns des autres pour éviter un éventuel mélange géographique des populations. Dans chacun de ces 4 sites d'études, 2 gîtes de prélèvement ont été choisis : l'un traité par l'E.I.D. depuis plus de 20 ans, l'autre gîte non traité. Les gîtes choisis se situent :

- 1- aux alentours de Lyon : Pont de Chérury & Saint-Maurice de Gourdans
- 2- au Nord du lac du Bourget : Pugieu & Aignos
- 3- aux alentours de Grenoble : Tizin et Saint-Quentin sur Isère
- 4- à la limite Ain-Isère : Colomier & Vezeronce.

Sur chacun des gîtes (8 en tout), nous avons prélevé des larves sauvages sur lesquelles nous avons effectué des mesures de mortalité associées à des traitements insecticides en laboratoire.

II. Effet d'un historique de traitement Bti sur le terrain sur la tolérance au Bti

Les figures 24 et 25 présentent les pourcentages de mortalité sur chacun des 4 sites d'études, respectivement en 2005 et 2006. En 2005, nous observons que sur 3 d'entre eux, il existe un effet significatif du traitement *Bti* où les larves issues des gîtes traités sont moins sensibles au *Bti* que les larves issues des gîtes non traités. Ce résultat est modéré par le site 3 où la différence de mortalité est non significative, mais où les larves provenant des gîtes non traités semblent moins sensibles que les larves provenant des gîtes traités au *Bti*. En 2006, la tendance reste la même et les résultats portant sur les larves prélevées sur le site 1 s'expliquent probablement par la très petite taille des larves issues du gîte traité.

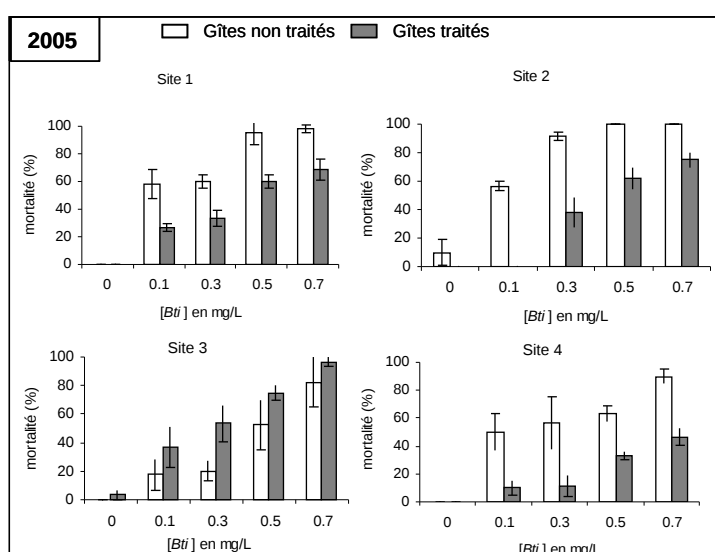


Figure 24. Mortalité des larves sauvages d'*Aedes rusticus* prélevées en 2005 sur 4 sites et soumises, au laboratoire, à différentes concentrations en *Bti*.

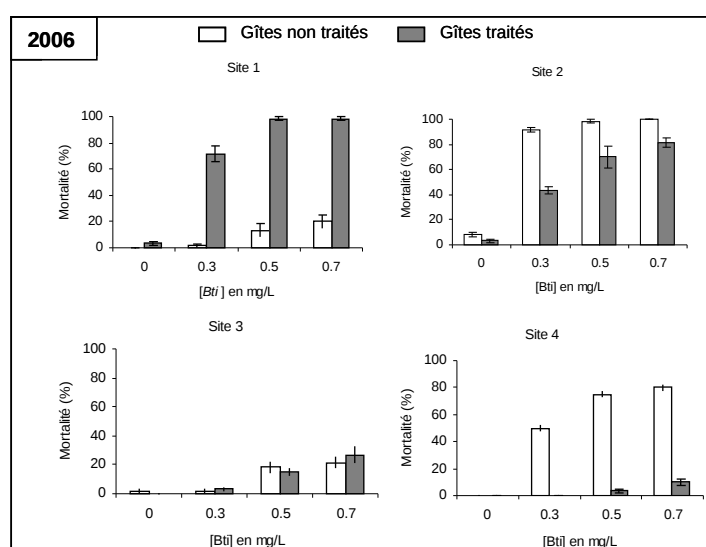


Figure 25. Mortalité des larves sauvages d'*Aedes rusticus* prélevées en 2006 sur 4 sites et soumises, au laboratoire, à différentes concentrations en *Bti*.

Il semblerait que le seul gîte non traité issu du site 3 présente une sensibilité plus faible au *Bti* qu'un gîte traité. La particularité de ce gîte par rapport aux autres gîtes non traités est qu'il se situe dans une zone cultivée. Aussi, le site 3 pourrait être le réceptacle de divers pesticides utilisés sur les zones agricoles voisines, ces pesticides pouvant modifier eux aussi les capacités de détoxification des larves du site 3.

Tableau 8. Analyse Split-plot de l'effet traitement sur la sensibilité des larves d'*A. rusticus* avec les variables traitement (N = 2), site d'étude (N = 4) et concentration de bioessais (N = 5)

Effet traitement	DF	F	P
année 2005	1	3,43	0,113
année 2006	1	2,997	0,226

L'analyse globale des valeurs de mortalité montre qu'il n'existe pas d'effet traitement significatif ni en 2005, ni en 2006 (Tableau 8). Sur l'ensemble des 4 sites d'étude, il n'existe ainsi pas de différences de mortalité au *Bti* dues aux traitements insecticides.

D'après notre expérimentation de terrain, les tests statistiques ne démontrent aucun effet des traitements insecticides sur la sensibilité des larves au *Bti*, contrairement à notre hypothèse *a priori* basée sur des différences de mortalité observée avec *Ochlerotatus cataphylla*. Cependant sur 3 des 4 gîtes, nous observons une différence de mortalité dans le sens de notre hypothèse. Ce travail aurait mérité un plus grand nombre de réplicats pour savoir si le site 3 est un site à part ou s'il est sous évalué dans notre travail. La seconde année (2006), nous avons eu des problèmes inhérents à tout travail de terrain avec des larves de tailles très variables.

Il existe une opposition entre les observations ponctuelles de terrain qui montrent des différences de sensibilité dues aux traitements insecticides et les résultats statistiques qui démontrent qu'il n'existe aucune différence de mortalité. La seule autre étude de terrain sur une possible résistance des larves de moustique au *Bti*, en Allemagne, montrait également une absence de cette résistance (Becker et Ludwig 1993).

III. Conclusion

Nos deux études précédentes, mettant en jeu des populations sauvages de moustiques de deux espèces bien présentes en Rhône-Alpes, démontrent clairement que l'historique de la gestion par insecticides des zones humides conditionne complètement l'évolution de ces populations. L'évolution des populations d'*O. cataphylla* est la plus claire, les gîtes traités de longue date par le téméphos d'abord puis par le *Bti* sont actuellement colonisés par des populations largement tolérantes aux insecticides que la population issue du gîte jamais traité. Les résultats obtenus avec la seconde espèce, *Aedes rusticus*, nous oblige à nuancer notre propos en ce qui concerne l'apparition d'une éventuelle résistance au *Bti* sans permettre toutefois d'écarter cette hypothèse.

Enfin, la complexité chimique liée aux divers xénobiotiques percolés ou drainés vers les zones humides nous conduit à penser que des mécanismes de pré-exposition et/ou sélection provoqués par de telles molécules peuvent générer l'augmentation des capacités de détoxification vis-à-vis de pesticides très variés. Des dosages de polluants organiques dans les différents gîtes humides étudiés auraient pu nous permettre de mieux argumenter l'éventuelle relation entre pollutions organiques et degré de tolérance des larves aux insecticides. Repartant d'une réalité de terrain (site 3 de l'étude *A. rusticus*), nous avons testé la possibilité d'une acquisition de tolérance aux insecticides pour des larves de moustiques soumises à des contacts prolongés avec de faibles concentrations en divers xénobiotiques.

C - Pré-exposition avec d'autres xénobiotiques

Plus de 100 000 produits chimiques sont utilisés régulièrement par l'homme et sont des contaminants et polluants potentiels des écosystèmes (Maugh 1978a; 1978b). En ce qui concerne plus particulièrement les pesticides, c'est dans les années 40 que les premiers composés organiques de synthèse sont apparus sur le marché, avec des résultats très positifs sur l'augmentation des rendements agricoles. Parmi ces composés, l'un des plus massivement utilisés est l'herbicide atrazine avec 100 000 tonnes utilisés par an dans le monde (Barcelo 1993). Cet herbicide étant utilisé jusqu'en 2003 (année de l'interdiction en France) dans une zone proche d'un de nos sites, nous avons décidé de tester en laboratoire notre hypothèse de terrain en étudiant plus précisément l'effet d'une pré-exposition de cet herbicide sur la résistance larvaire à nos deux insecticides de référence.

I. L'atrazine est-elle capable d'influencer la sensibilité larvaire au Bti et au téméphos ?

Nous étudions une mise en contact de larves d'*A. aegypti* avec un herbicide, l'atrazine, sur la sensibilité des larves au *Bti*. L'atrazine est un herbicide de la famille des triazines (Figure 26). C'est un inhibiteur du transfert d'électrons chloroplastiques agissant sur le photosystème II et bloquant la photosynthèse. Utilisé massivement depuis 50 ans, il est encore détecté dans l'eau jusqu'en 2005. Durant la période d'utilisation en France, il n'était pas rare de retrouver dans les eaux de surface une concentration de l'ordre de 1 µg/L (Franck *et al.* 1987). Cela explique la raison pour laquelle nous avons repris cette concentration dans nos expérimentations.

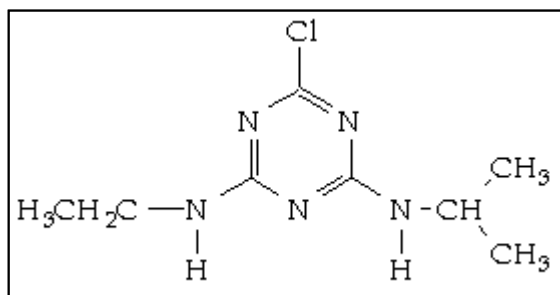


Figure 26. Formule chimique de l'atrazine

1 - Effet d'une pré-exposition avec l'atrazine sur la mortalité au *Bti*

Les larves sont pré-exposées à une dose non létale d'atrazine dans le but d'évaluer un effet à court terme sur la sensibilité larvaire au *Bti*. Des tests toxicologiques au préalable ont montré que l'atrazine n'entraînait aucune mortalité sur les larves de moustiques. Des échantillons biologiques homogènes (comprenant 100 larves de stade 4 et de taille identique) sont exposés pendant 0h, 6h, 12h, 24h et 48h à différentes concentrations d'atrazine (Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France) : 1, 10, 100 et 1000 µg/L. Les bioessais sont réalisés à 0, 0,2, 0,5 et 1 mg/L de *Bti*.

Globalement, la préexposition des larves de moustiques à l'atrazine quelque soit la concentration (comprise entre 1 et 1000 µg/L) et le temps d'induction (6 h, 12 h, 24 h et 48 h), diminue significativement la mortalité larvaire au *Bti* ($F = 1,546$, $df = 48$, $P = 0,010$) (Figure 27). A 1 mg *Bti*/L, aucun effet significatif n'est observé, dû à des taux de mortalité trop élevés. A 0,2 et 0,5 mg *Bti*/L (respectivement $F = 1,380$, $df = 153$, $P = 0,004$, et $F = 1,400$, $df = 153$, $P = 0,003$), les résultats indiquent un effet du temps de pré-exposition quelque soit la concentration de pré-exposition.

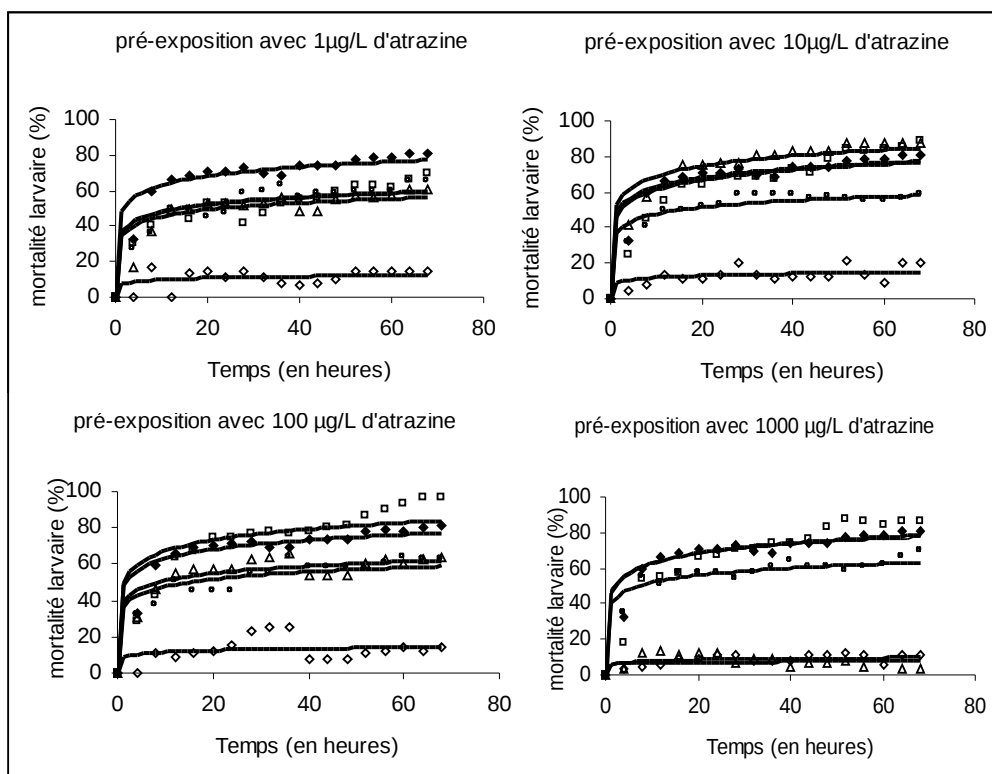


Figure 27. Cinétiques de mortalité des larves d'*Aedes aegypti* à 0.5 mg/L de *Bti*, en fonction de la concentration et du temps de pré-exposition avec l'atrazine. Les larves ont été pré-exposées avec l'atrazine pendant 0h (◆), 6h (□), 12h (Δ), 24h (○) et 48h (◇).

Les larves témoins et les larves pré-exposées 6 h présentent les taux de mortalité les plus forts au *Bti*. Les larves pré-exposées durant 48h, de 1 à 1000 µg d'atrazine/L montrent une diminution de la sensibilité des larves au *Bti*. Bien que dans cette étude 48 h soit notre temps d'exposition le plus long, ce temps apparaît court *in natura*. Tous ces résultats

indiquent que la présence de faibles concentrations d'atrazine peut modifier sur le terrain la sensibilité des larves au *Bti*. Un contact bref d'un point de vue environnemental (48h) entre des larves d'*Aedes aegypti* et l'atrazine conduit à une modification de la sensibilité des larves à un insecticide: l'atrazine entraîne une diminution de la mortalité des larves au *Bti*.

2- Effet d'une pré-exposition avec l'atrazine sur la mortalité au téméphos

Nous avons réalisé le même type d'expérimentation avec le téméphos. La pré-exposition des larves avec l'atrazine réduit la mortalité au téméphos (Figure 28). L'ANOVA nous indique un effet significatif de la pré-exposition et du temps de bioessais (données non présentées). Pour des larves pré-exposées avec 10 µg/L d'atrazine, le test nous indique un effet significatif, indépendamment du temps des bioessais. Pour une pré-exposition avec des concentrations d'atrazine plus faibles (0,1 et 1 µg/L), l'effet de la pré-exposition varie avec le temps des bioessais. Avec 0,1 et 1 µg/L d'atrazine, des différences importantes dans les sensibilités larvaires apparaissent avec des temps courts de contact avec le téméphos, c'est à dire que les différences entre larves pré-exposées à l'atrazine et larves non exposées ne sont plus significatives à 24 et 48 heures. Avec une pré-exposition à 10 µg/L, la non-significativité de l'interaction "Pré-exposition x Temps de Bioessais" est due au manque de différences significatives dans la mortalité.

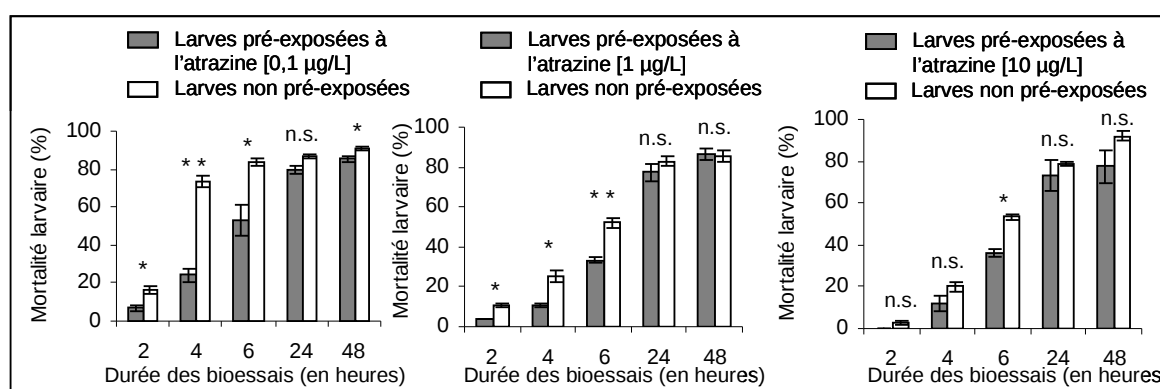


Figure 28. Cinétiques de mortalité des larves d'*Aedes aegypti* au téméphos à 8 µg/L (n.s. = non significatif, * p < 0,05, ** p < 0,01).

Pour déterminer l'influence de l'atrazine sur la mortalité des larves au téméphos, nous avons utilisé la Concentration Létale 50 (CL₅₀). Nous avons réalisé les bioessais avec quatre concentrations de téméphos par opposition aux cinétiques de mortalité présentées ci-dessus avec une seule valeur de téméphos. Les valeurs de CL₅₀ plus élevées chez les larves pré-exposées que chez les larves non exposées nous indiquent que les larves pré-exposées sont plus tolérantes au téméphos que les larves non exposées (Tableau 9) quelque soient les temps de bioessais et les concentrations d'atrazine utilisées. Cette expérience, avec un plus large panel des concentrations de téméphos, nous montre des différences de mortalité au téméphos à 24h non observées dans nos précédents essais.

Tableau 9. CL₅₀ (en µg/L) des larves pré-exposées et non pré-exposées à l'atrazine après 6 et 24 heures de bioessais au téméphos.

Concentration d'atrazine	Temps de Bioessais	Larves non exposées	Larves pré-exposées
0.1µg/L	6 h	5.39	7.47
	24 h	3.62	5.88
1 µg/L	6 h	8	9.17
	24 h	3.04	4.97
10 µg/L	6 h	7.5	19.19
	24 h	1.07	3.38

II. Effet d'une pré-exposition avec des xénobiotiques divers sur la mortalité larvaire au Bti.

Après avoir étudié les effets de l'atrazine sur la mortalité larvaire, nous nous sommes proposé de tester l'effet d'une mise en contact des larves d'*A. aegypti* avec divers xénobiotiques, de type polluants ou pesticides, sur leur sensibilité au *Bti*. Parmi les différents xénobiotiques testés, nous avons pré-exposé les larves avec deux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le fluoranthène et le phénanthrène, deux sels de métaux lourds, l'acétate de mercure et le nitrate de plomb, deux fongicides, le fludioxonil et le cyprodinil, ainsi que l'atrazine.

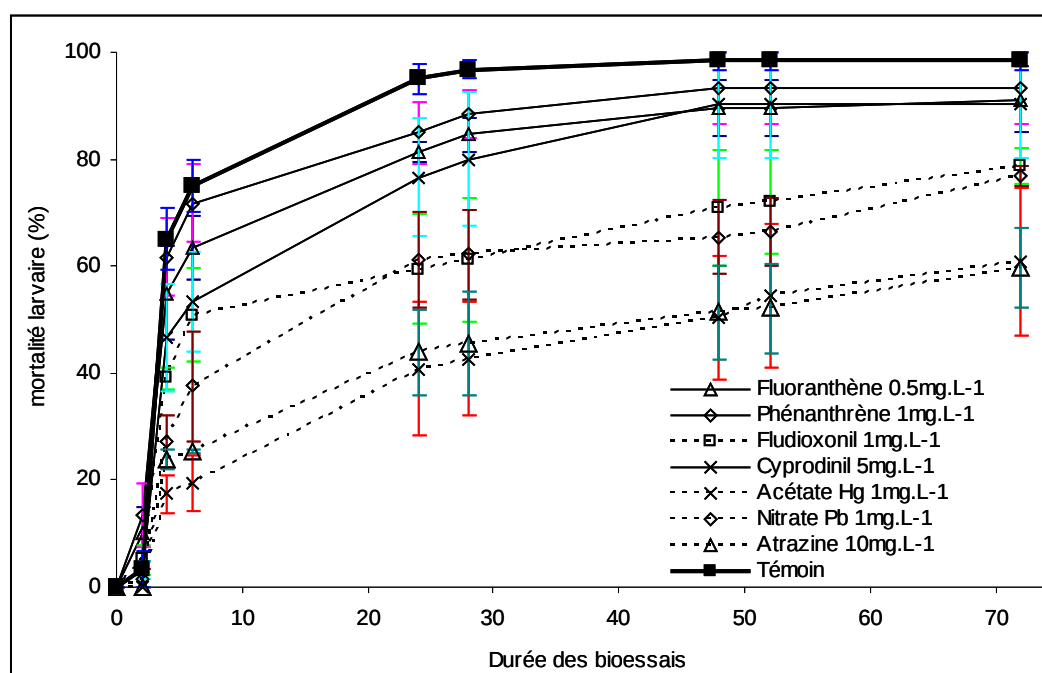


Figure 29 : Effet de la pré-exposition des larves d'*Aedes aegypti* à une dose sub-létale de différents xénobiotiques sur leur tolérance au *Bti* (0.2 mg/L).

Seuls deux lots sont significativement plus tolérants que le lot témoin : les lots induits à l'atrazine et à l'acétate de mercure (Figure 29). Cependant, cette expérience dégage une tendance à exploiter. En effet, le faible nombre de réplicas ne nous permet pas de conclure à un effet du fludioxonil et du nitrate de plomb sur une diminution de la mortalité des larves de moustiques au *Bti*. D'autres études pourront être réalisées pour approfondir et préciser ces résultats.

III. Conclusion

Notre étude montre qu'un herbicide, agissant spécifiquement au niveau du photosystème II dans les plantes, conduit à une diminution de la sensibilité des larves d'insectes à un insecticide. Ce résultat est en accord avec 2 récentes études qui ont montré que l'atrazine pouvait augmenter l'activité d'enzymes de détoxification connues pour intervenir dans la résistance à des pesticides (Londono *et al.* 2004; Yu 2004). L'augmentation des enzymes de détoxification due aux triazines a été démontrée chez la légionnaire d'automne (*Spodoptera frugiperda*, Smith), mais aussi chez le moustique. Cette étude, impliquant les activités cyt P450, montre une augmentation des activités enzymatiques chez *S. frugiperda* après pré-exposition à l'atrazine (Yu 2004). Un travail similaire montre une augmentation des activités des oxydases microsomaux (incluant les cyt P450), des hydrolases (incluant les estérases), des GSTs et des réductases dans les corps gras et dans l'intestin chez *Chironomus tentans* (Londono *et al.* 2004). Ces résultats sont intéressants car ces enzymes, reconnues pour intervenir dans la résistance aux insecticides chez les moustiques (Scott 1999), augmentent fortement dans le milieu intestinal et parce que le *Bti* agit au niveau intestinal.

Les herbicides, contrairement à d'autres polluants qui peuvent entraîner une résistance aux traitements insecticides, sont utilisés intentionnellement dans les agrosystèmes. D'un point de vue environnemental, 1 µg d'atrazine/L est une concentration commune dans les milieux aquatiques naturels (Franck *et al.* 1987). Ainsi nos résultats ont une possible réalité environnementale, spécialement dans les zones humides (Franck *et al.* 1987; Southwick *et al.* 1990). La diminution de la mortalité au *Bti* dépend de la durée d'exposition. Bien que 48h soit le plus long temps d'exposition dans notre expérience, il semble court pour une exposition possible *in natura*. Ces 2 résultats mettent en lumière le besoin de compréhension du devenir des produits chimiques dans l'eau et leur possible effet sur le métabolisme des insectes, en particulier les vecteurs de maladies. Notre travail montre également l'importance d'approches écologiques pour mieux comprendre les dysfonctionnements possibles des espaces anthropisés. Enfin cette étude ajoute de nouvelles données pour le contrôle des moustiques. Les traitements triaziniques pourraient, par leurs capacités à induire des enzymes de détoxification, amplifier de manière indirecte le problème invasif des espèces d'*Aedes* et donc faciliter la dispersion de moustiques vecteurs de maladies. Une plus grande connaissance de la résistance chez les moustiques pourrait faciliter une considération plus forte des moustiques comme marqueurs de restauration d'écosystèmes humides, comme l'indique un article de synthèse récent (Willott 2004).

Chapitre 5 : Discussion générale

A – Les xénobiotiques dans les gîtes à moustique

I. Contexte environnemental

Les gîtes à moustiques sont soumis à différentes sources de xénobiotiques (Figure 30). Les xénobiotiques naturels (composés végétaux) sont issus du fonctionnement normal de l'écosystème. Par contre, les xénobiotiques anthropiques sont soit introduits volontairement dans cette zone humide (insecticides utilisés en démoustication), soit retrouvés dans ces gîtes à moustiques de manière non voulue par l'homme (par exemple polluants et pesticides utilisés en agriculture). Ce regroupement de xénobiotiques d'origine et de nature variées semble jouer un rôle majeur dans la réponse adaptative des larves de moustiques aux insecticides.

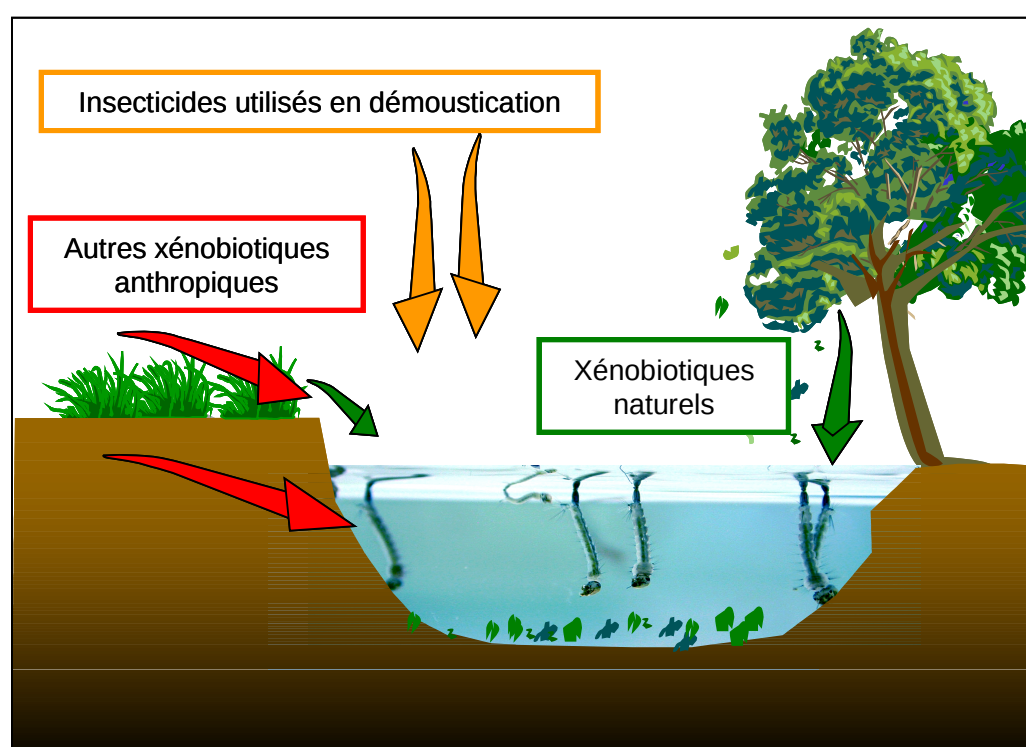


Figure 30. Entrées des différents xénobiotiques dans un écosystème « zone humide » géré pour une lutte anti-moustiques

II. Xénobiotiques et évolution de la résistance

Parce que l'état larvaire détermine généralement la future niche écologique du moustique (Milam *et al.* 2000), la résistance larvaire aux toxiques environnementaux détermine les capacités adaptatives *in situ* des populations de moustiques. La résistance des larves aux xénobiotiques naturels et d'origine anthropique au sein d'une même population larvaire de moustique apparaît comme étant le résultat combiné d'un processus complexe de pré-adaptation à court-terme et de sélection à plus long terme.

Les xénobiotiques naturels, essentiellement d'origine végétale et présents depuis l'apparition des plantes, peuvent être considérés comme un facteur de coévolution entre les moustiques et la végétation. Ainsi, une ségrégation écologique des populations de moustiques par le type de végétation des zones humides s'effectue à long terme. Inversement, les xénobiotiques anthropiques apparaissent comme un facteur évolutif récent, les traitements insecticides agissant comme facteur de sélection fort, et les autres xénobiotiques de synthèse comme éléments possibles de coévolution par leur impact diffus dans l'environnement et leurs conséquences variables sur le métabolisme des larves.

III. Hypothèses sur la résistance

L'idée d'une augmentation de la tolérance à un xénobiotique sous l'effet d'un autre composé chimique est une idée développée à la fin des années 1950 (Hoffman 1962; Hoffman 1978). De tels xénobiotiques recherchés en agriculture mais aussi en médecine sont appelés des « antidotes » (Hatzios 1989). Nos résultats tendent tous vers la même conclusion, à savoir qu'il existerait un mécanisme antagoniste mettant en jeu les enzymes de détoxification plutôt qu'un mécanisme compétitif (Figure 31). Nous ne pouvons exclure que, sur le même principe d'action, des xénobiotiques de synthèse à l'origine des pollutions diffuses dans les gîtes à moustiques soient impliqués dans l'apparition de formes de résistance aux insecticides chez les populations de moustiques.

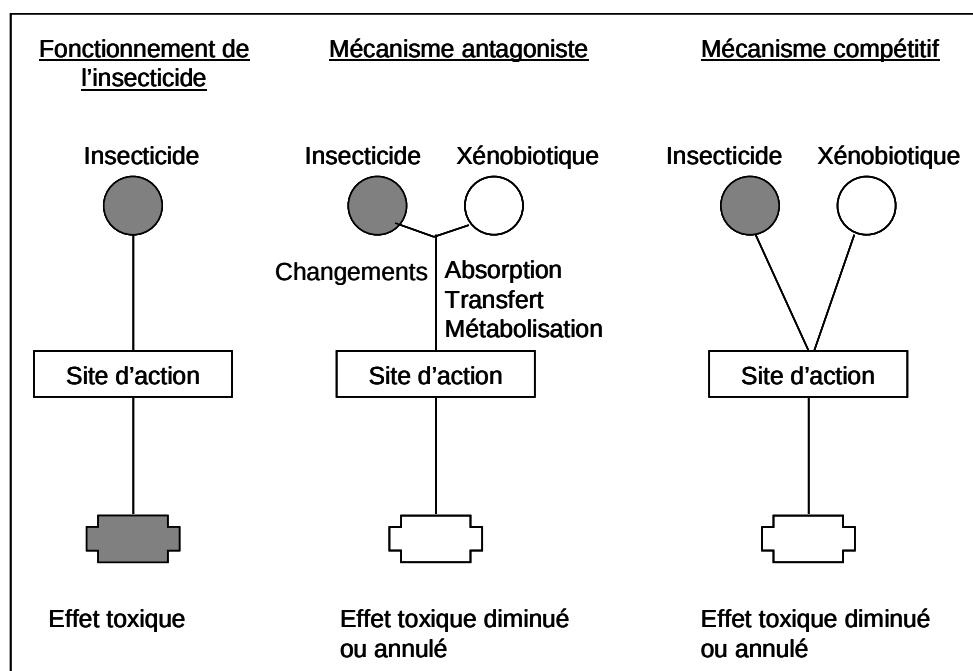


Figure 31. Représentation schématique des mécanismes possibles d'interaction de xénobiotiques sur le mode d'action des insecticides (d'après Hatzios 1989).

L'emploi d'insecticides pour lutter contre les larves de moustiques conduit à l'apparition de phénomènes de résistance réduisant considérablement l'efficacité des traitements (Brogdon et McAllister 1998). Chez différentes espèces de moustiques ces résistances ont déjà été démontrées pour des insecticides conventionnels (Raymond *et al.*

1986; Raymond *et al.* 1998; Hemingway 2000). Les systèmes de défense contre les xénobiotiques sont connus pour être parfois induits par les produits qu'ils sont capables de détoxifier (Terriere 1984). Le rôle des pesticides utilisés en agriculture dans le développement des mécanismes de résistance aux insecticides dans les populations de moustiques a également été avancé (Diabate *et al.* 2002).

L'acquisition de la résistance, résistance comportementale exceptée et définie comme la capacité d'une souche à tolérer des doses de toxines habituellement létales pour la plupart des individus au sein d'une population normale (Mullin et Scott 1992), apparaît 1) soit par une mutation dans l'ADN conduisant à une diminution de la sensibilité du site-cible, et/ou à une modification des activités enzymatiques constitutives de détoxication 2) soit par une élévation de l'expression des gènes entraînant une augmentation des activités des enzymes de détoxication au contact du xénobiotique (Ishaaya 2001).

IV. Complexité des mécanismes impliqués

La résistance métabolique aux xénobiotiques est un mécanisme rencontré dans de nombreuses interactions plantes-insectes (Brattsten 1988; Berenbaum et Zangerl 1999). Bien que ce phénomène soit très étudié dans les écosystèmes terrestres (Cohen *et al.* 1989) (Berrada *et al.* 1994), il est beaucoup moins documenté pour les écosystèmes aquatiques d'eau stagnante qui constituent les sites de vie des moustiques. Cela apparaît d'autant plus important que pour tout organisme vivant, la résistance aux xénobiotiques est l'une des clés de l'adaptation permettant de survivre et de coloniser différentes niches écologiques.

Cependant, la situation environnementale *in natura* est très complexe compte tenu du nombre de paramètres et de xénobiotiques mis en jeu. Ainsi il apparaît nécessaire de travailler en système simplifié pour comprendre les mécanismes mis en jeu dans les écosystèmes. Transposer une situation naturelle complexe en conditions contrôlées, c'est se donner la possibilité d'analyser les mécanismes d'interactions, difficiles à mettre en œuvre sur le terrain.

B – Impact des xénobiotiques sur la tolérance larvaire aux

insecticides

Dans la compréhension des effets des xénobiotiques sur la tolérance larvaire aux insecticides, il nous a semblé pertinent de séparer notre réflexion en 2 parties distinctes :

- le travail effectué avec une litière toxique comme exemple de xénobiotique naturel,
- le travail réalisé avec 2 insecticides classiques et d'autres xénobiotiques de synthèse.

I. Xénobiotiques naturels : exemple d'une litière toxique

Notre travail avec la litière toxique a pour objet de comprendre la ségrégation écologique des espèces et l'influence de ces composés naturels sur la tolérance larvaire aux insecticides. Les herbivores polyphages montrent en général peu de spécificité dans leurs enzymes de détoxication dans le but de s'adapter à

une large diversité de plantes utilisée pour leur régime alimentaire (Li *et al.* 2002). Les larves de moustiques sont considérées comme des détritivores non sélectif, incapables de discriminer les particules alimentaires qu'elles ingèrent (Clements 1992; Clements 1999). Ainsi, les larves de moustiques sont supposées posséder un équipement enzymatique diversifié leur permettant de faire face à un grand nombre de xénobiotiques potentiellement présents dans leur alimentation.

Notre travail avec une lignée de moustique sélectionnée avec cette litière toxique nous a montré son fort pouvoir de sélection. En effet nous avons obtenu une lignée significativement plus tolérante à cette même litière, au téméphos et au *Bti* que la lignée d'origine. Cette baisse de sensibilité vis-à-vis de ces insecticides est expliquée en grande partie dans notre travail par une augmentation forte de toutes les activités enzymatiques de détoxification que nous avons mesurées. Une pré-exposition avec ces xénobiotiques naturels entraîne également une augmentation de la tolérance à ces insecticides et une augmentation de certaines activités métaboliques de détoxification. *In natura*, un phénomène de pré-exposition est plutôt synonyme d'évènements ponctuels et pourrait être reliée à l'évolution de la végétation (cycle saisonnier d'apport et de dégradation des litières végétales) tandis qu'une sélection serait plus le fait d'une contamination chronique sur le long terme (végétation environnante).

Une évolution sur le long terme avec une sélection entraîne une résistance constitutive. D'un autre côté, une pré-exposition permet une activation d'éléments de régulation des enzymes de détoxification. Il est évident que, dans les habitats naturels du moustique, à la fois l'induction et la sélection des enzymes de détoxification jouent un rôle complémentaire, dépendant de la présence des xénobiotiques rencontrés dans l'environnement. Cela est en accord avec le fait que l'activité des systèmes de détoxification est généralement modulée dans le temps et dans l'espace en relation avec les caractéristiques qualitatives et quantitatives du xénobiotique ingéré (Snyder *et al.* 1993; Wheeler *et al.* 1993).

II. Xénobiotiques d'origine anthropique

Les insecticides représentent une pression de sélection forte dans les zones humides traitées contre les moustiques par un traitement régulier, répété entraînant une forte mortalité. Notre travail de terrain a démontré l'importance de l'historique des traitements dans la tolérance aux insecticides, dans le sens où plus les populations ont été longtemps exposées à deux insecticides, avec des modes d'action différent, plus elles sont tolérantes à ces derniers. En particulier nous pensons qu'il est possible qu'une résistance au *Bti*, même si nous ne l'avons pas clairement démontrée, soit en train d'émerger dans la région Rhône-Alpes sous la pression des traitements avec cet insecticide.

Dans ce travail de terrain, nous avons également observé une différence de mortalité liée à la présence de cultures aux alentours et nous avons avancé une incidence possible des pesticides et polluants issus de l'agriculture sur la tolérance des larves aux insecticides. L'exemple le plus illustré dans cette thèse est celui du rôle joué par l'atrazine sur la tolérance aux insecticides : cet herbicide est capable d'entraîner une diminution forte de l'efficacité de 2 insecticides ayant des modes d'action très différents. Il est particulièrement intéressant

d'observer une résistance au *Bti*, après pré-exposition des larves à l'atrazine. En effet, cet herbicide, même à des concentrations très fortes et non retrouvées dans l'environnement, n'entraîne aucune mortalité sur les larves de moustiques. Cela signifie que la présence de certains xénobiotiques, à des concentrations non létales pour les larves peut induire des mécanismes de résistance aux insecticides.

En parallèle, nous avons observé un effet sur la tolérance larvaire lié à d'autres xénobiotiques de synthèse (HAP, métaux lourds, fongicides). Cette observation ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de la résistance aux xénobiotiques, en particulier, elle soulève la question de l'impact et du rôle que jouent les polluants et composés agrochimiques dans les phénomènes de résistance et d'invasivité observés chez les moustiques.

La polyvalence et la complémentarité des enzymes impliquées dans ces processus apparaissent comme des facteurs clefs dans la plasticité adaptative de ces populations de moustiques. Une telle plasticité adaptative pourrait continuellement évoluer afin d'optimiser la « fitness » des larves en fonction de la variabilité spatio-temporelle de présence des xénobiotiques dans les gîtes à moustiques. Cette adaptation très dynamique pourrait permettre le maintien des populations dans des gîtes à moustique aux caractéristiques physico-chimiques changeantes, mais aussi la colonisation de nouveaux habitats.

III. Comment expliquer les mécanismes d'une augmentation de la tolérance au

Bti ?

Nous avons montré tout au long de ce travail qu'une diminution de mortalité au *Bti* était fortement corrélée à une augmentation de la résistance métabolique. Mais cette relation est loin d'être aussi évidente que ne le laisse supposer ce manuscrit.

Dans un premier temps, il a été supposé qu'aucun mécanisme de résistance au complexe protéique cristallin du *B. thuringiensis* ne pourrait se mettre en place. Avec *Plodia interpunctella*, une espèce de lépidoptère, on a démontré en laboratoire l'apparition d'une résistance (augmentation de sa tolérance 30 fois) en quelques générations seulement (McGaughey 1985). Une différence de tolérance est également apparue entre une population de cette même espèce provenant d'un champ traité et une autre provenant de zones non traitées. Cette résistance provenait d'une modification de conformation des sites récepteurs de la toxine (Van Rie *et al.* 1990).

Concernant plus particulièrement le *Bti* et les moustiques, jusqu'ici ni Georghiou (Georghiou 1990), ni Gharib (Gharib et Hilsenhoff 1988; Gharib *et al.* 1989), ni Becker et Ludwig (Becker et Ludwig 1993) n'ont démontré de diminution significative de sensibilité des larves de moustiques au *Bti*. Dans cette dernière étude (Becker et Ludwig 1993), en comparant une population d'*Aedes vexans* traitée depuis 10 ans et une population non traitée, aucune résistance au *Bti* n'a été observée. Sur une population de laboratoire de *Culex quinquefasciatus* sélectionnée au *Bti* pendant 32 générations, une diminution de la sensibilité a été observée (5 fois), tolérance disparaissant après seulement 3 générations additionnelles sans pression de sélection (Saleh *et al.* 2003).

Jusqu'ici seul le mécanisme impliqué dans le changement du récepteur a été avancé pour expliquer une tolérance au *Bti* (Ferre et Van Rie 2002). Cependant dans certains cas l'implication d'enzymes de détoxification a été observée. Une surexpression des activités estérases, qui se fixerait sur la toxine du *Bti* a été récemment décrite chez une souche de *Helicoverpa armigera* résistante au *Bti* (Gunning *et al.* 2005). On pourrait comprendre l'implication des enzymes de détoxification comme une réponse soit au stress occasionné par la toxine, soit à d'éventuels produits de dégradation. Néanmoins il reste difficile d'avancer une hypothèse quant à une action des enzymes de détoxification (intracellulaire) sur les toxines du *B. thuringiensis* (extracellulaire). Ce dernier point mérite sans aucun doute de plus amples travaux de recherche.

C – Réflexions sur la complexité du terrain et la simplification

expérimentale en laboratoire

Les paramètres de terrain sont multiples et donc difficiles à analyser. Aussi, l'analyse des mécanismes conduisant à cette complexité doit être abordée au laboratoire. Cette étape est une nécessité pour comprendre les mécanismes impliqués dans les phénomènes observés sur le terrain. Il n'en reste pas moins que les résultats obtenus au laboratoire n'ont de sens qu'après validation sur le terrain, la situation de laboratoire ne permettant pas de recréer tous les paramètres de l'écosystème considéré.

D'un point de vue expérimental, de nombreuses données manquent dans ce travail, en particulier la caractérisation des paramètres physico-chimiques de l'eau des gîtes à moustiques. D'autres activités enzymatiques liées aux processus de détoxification auraient pu être mesurées. Yu *et al.* (2001; 2002; 2004) mesurent 10 activités enzymatiques pour les oxydases microsomales, 8 pour les hydrolases, et testent 13 substrats pour les GSTs. Enfin, pour les mesures des activités cyt P450, j'aurais souhaité travailler sur des extraits de broyats de larves pour exprimer les résultats en unités par milligramme de protéines, et non par individu. En effet, une même unité d'expression des résultats nous aurait permis de pouvoir comparer ces différentes activités entre-elles.

Si le temps et les moyens l'avaient permis, nous aurions pu intégrer dans ces études, et en particulier dans les études de terrain, des techniques émergentes. Je pense en particulier aux outils moléculaires de génétiques des populations (AFLPs, dARTs) et de transcriptomique (puces à ADN) qui auraient permis de chercher, voire de trouver, des gènes potentiellement impliqués dans les différences de mortalité observées *in natura*. Il serait aussi intéressant de développer une analyse spatialisée en utilisant des systèmes d'informations géographiques (SIG) permettant de corréler la présence de xénobiotiques (dosages de pesticides et de polluants), les traitements et la tolérance des populations aux insecticides.

Chapitre 6 : Conclusion et Perspectives

Mes questions initiales étaient de mettre en évidence des mécanismes d'acquisition d'une tolérance aux insecticides téméphos, *Bti* et litière toxique, de savoir si de tels mécanismes existaient sur des espèces sauvages, et de déterminer s'il existait une résistance *in situ* au traitement *Bti*. Je pense avoir répondu à ces 3 questions mais je ne suis pas sûr d'avoir répondu aux attentes du gestionnaire. Cependant, l'une des conséquences directes de mon travail est l'instauration par l'EID d'un suivi de la résistance chez les populations culicidiennes des zones traitées en Rhône-Alpes.

L'aptitude des insectes à s'adapter aux conditions du milieu est importante du fait de cycles de générations courts, d'une forte fécondité, d'un fort potentiel de déplacement (vol en particulier pour les moustiques) qui permet la colonisation de nouvelles niches écologiques. Avec ce travail, nous avons pu entrevoir avec quelle vitesse le moustique est capable de s'adapter à de nouvelles molécules insecticides, aussi complexes soient-elle. Si l'on admet que les xénobiotiques, et pas seulement les insecticides, jouent un rôle dans la résistance des larves aux insecticides, on peut se demander si les activités humaines, responsables de la complexité chimique grandissante dans l'environnement, influent sur la vitesse d'acquisition de la résistance des moustiques. L'étude sur la résistance des insectes ne peut être figée car celle-ci est en constante évolution. Ainsi, nous pouvons nous demander quelle est la meilleure façon de réguler ces populations et s'il peut exister un moyen de lutte évolutif.

Des études pluridisciplinaires de la résistance des insectes et des plantes aux pesticides sont nécessaires pour déterminer comment peut apparaître une résistance à un insecticide ou à un herbicide après exposition à une autre famille de pesticides, et si des complémentarités existent entre ces mécanismes de détoxification.

Nos résultats peuvent avoir des répercussions environnementales. Si l'exposition à des polluants diminue la sensibilité des larves de moustiques aux insecticides, l'augmentation des pollutions environnementales (en particulier dans l'eau) pourrait affecter les conditions de lutte contre les moustiques. Outre les arguments couramment employés pour la protection des zones humides (biodiversité importante, rôle tampon lors des crues, rôle purificateur pour l'eau), si les polluants augmentent les problèmes de gestion des populations de nuisibles, cela devient un argument supplémentaire de préservation et de protection de ces zones humides.

Notre travail de terrain présente une certaine faiblesse par manque de caractérisation physico-chimique des gîtes à moustiques. Nous n'avons pu appuyer scientifiquement notre hypothèse sur une possible relation entre des perturbations chimiques de l'eau et le potentiel de résistance des larves aux insecticides. Afin de palier ce manque, j'ai élaboré un projet de recherche avec un laboratoire chinois (Professeur Zhang, Institute of Urban Pests and Department of Plant Protection, Huazhong Agricultural University, China) dans lequel nous allons essayer de déterminer le poids de l'anthropisation d'un gîte à moustique par la caractérisation de l'eutrophisation du milieu (mesure d'azote, de phosphate...), des pressions agricoles exercées sur le milieu (mesures de pesticides entre autres) et des pollutions alentours (mesure des taux de métaux lourds, de HAPs, de PCBs...). Une fois cette première étape du travail réalisée, nous tenterons de déterminer quels facteurs environnementaux (traitements insecticides, anthropisation du milieu, pollution) ont un réel impact sur la résistance des diverses populations de moustiques aux insecticides.

Chapitre 7 : Bibliographie

- Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **18**: 265-267.
- Andrande, C. F. S. et Modolo, M. 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Review Saude publications Sao Paulo* **25**(3): 184-187.
- Barcelo, D. 1993. Environmental protection agency and other methods for determination of priority pesticides and their transformation products in water. *Journal of chromatography* **343**: 117-143.
- Becker, N. 1998. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (BTI) against mosquitoes, with special emphasis of the ecological impact. *Israel Journal of Entomology* **XXXII**: 63-69.
- Becker, N. et Ludwig, M. 1993. Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Journal of the American Mosquito Control Association* **9**(2): 221-224.
- Berenbaum, M. et Zangerl, A. 1999. Herbivores: Between Plants and Predators. (Genetic variation in cytochrome P450-based resistance to plant allelochemicals and insecticides).
- Berrada, S., Fournier, D., Cuany, A. et Nguyen, T. X. 1994. Identification of resistance mechanisms in a selected laboratory strain of *Cacopsylla pyri* (Homoptera: Psyllidae): altered acetylcholinesterases and detoxifying oxidases. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **48**: 41-47.
- Bouvier, J. C., Cuany, A., Monier, C., Brosse, V. et Sauphanor, B. 1998. Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **39**(2): 55-64.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid And Sensitive Method For Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing Principle Of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Brattsten, L. B. 1979. Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals. *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolite*. A. G. Rosenthal et D. H. Jansen. New-York, Academic Press.
- Brattsten, L. B. 1988. Enzymic adaptations in leaf-feeding insects to host-plant allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology* **14**: 1919-1939.
- Brogdon, W. G. et McAllister, J. C. 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emergence of infectious diseases* **4**: 605-613.

- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A. et Heckelman, P. E., Eds. 1989. The Merck Index. 11th edition. Rahway, New-Jersey, USA, Merck & Co., Inc.
- Carson, R. 1962. Silent spring. Boston, Massachusetts, USA.
- Cheikh, H. B. et Pasteur, N. 1993. Resistance to temephos, an organophosphorous insecticide, in *Culex Pipiens* from Tunisia, north Africa. *Journal of the American Mosquito Control Association* **9**(3): 335-337.
- Clements, A. N. 1992. The Biology of Mosquitoes. (Development, nutrition and reproduction). Chapman & Hall.
- Clements, A. N. 1999. The Biology of Mosquitoes. (Sensory reception and behaviour). Chapman and Hall, London.
- Cohen, M. B., Berenbaum, M. R. et Schuler, M. A. 1989. Induction of cytochrome P450-mediated detoxification of xanthotoxin in the black swallowtail. *Journal of Chemical Ecology* **15**(9): 2347-2355.
- Cook, G. 1996. Manson's Tropical Disease.
- Cuany, A., Handani, J., Bergé, J. B., Fournier, D., Raymond, M., Georghiou, G. P. et Pasteur, N. 1993. Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes. *Pesticide Biochemistry and physiology* **45**: 1-6.
- Dauphin Villemant, C., Bocking, D., Tom, M., Maibeche, M. et Lafont, R. 1999. Cloning of a novel cytochrome P450 (CYP4C15) differentially expressed in the steroidogenic glands of an arthropod. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **264**(2): 413-418.
- David, J.-P. 2002. Les xénobiotiques des litières végétales en décomposition, médiateurs d'une relation plante-arthropode dans les gîtes à moustiques pré-alpins: de l'écologie chimique à la lutte biologique. Grenoble, Université Joseph Fourier: 101.
- David, J. P., Huber, K., Failloux, A. B., Rey, D. et Meyran, J. C. 2003. The role of environment in shaping the genetic diversity of the subalpine mosquito, *Aedes rusticus* (Diptera, Culicidae). *Molecular Ecology* **12**(7): 1951-1961.
- David, J. P., Rey, D., Cuany, A., Amichot, M. et Meyran, J. C. 2000a. Comparative ability to detoxify alder leaf litter in field larval mosquito collections. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **44**(4): 143-150.
- David, J. P., Rey, D., Marigo, G. et Meyran, J. C. 2000b. Larvicidal effect of a cell-wall fraction isolated from alder decaying leaves. *Journal of Chemical Ecology* **26**(4): 901-913.
- David, J. P., Rey, D., Pautou, M. P. et Meyran, J. C. 2000c. Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental breeding sites. *Journal of Invertebrate Pathology* **75**: 9-18.
- De Sousa, G., Cuany, A., Brun, A., Amichot, M., Rhamani, R. et Bergé, J. B. 1995. A microfluorimetric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on

- individuals *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Analytical Biochemistry* **229**: 86-91.
- Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akogbeto, M., Guiguemde, T. R., Darriet, F., Brengues, C., Guillet, P., Hemingway, J., Small, G. J. et Hougard, J. M. 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* SL in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**(6): 617-622.
- Dowd, P. F., Smith, C. M. et Sparks, T. C. 1983. Detoxication of plant toxins by insects. *Insect Biochemistry* **13**: 453-468.
- Epstein, P. R., Diaz, H. F., Elias, S., Grabherr, G., Graham, N. E., Martens, W. J. M., Mosley-Thompson, E. et Susskind, J. 1998. Biological and physical signs of climate change: Focus on mosquito-borne diseases. *Bulletin Of The American Meteorological Society* **79**(3): 409-417.
- Failloux, A. B. et Rodhain, F. 1999. Apport des études de génétique des populations de moustiques (Diptera: culicidae) en entomologie médicale. Exemples choisis en Polynésie française. *Annales de la Société Entomologique de France* **35**(1): 1-16.
- Fargues, J. et Bourguet, D. 2005. La lutte microbiologique contre les insectes ravageurs des cultures: cintraintes, bilan et perspectives. *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement*. E. T. DOC. Paris-Londres-New-York, Lavoisier: 1013.
- Ferre, J. et Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* **47**: 501-533.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology* **44**: 507-533.
- Fisher, T., Crane, M. et Callaghan, A. 2003. Induction of cytochrome P-450 activity in individual *Chironomus riparius* Meigen larvae exposed to xenobiotics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **54**(1): 1-6.
- Franck, R. J., Ripley, B. D., Braun, H. E., Clegg, B. S., Johnston, R. et O'Nerll, T. J. 1987. Survey of farm wells for pesticide residues, Southern Ontario, Canada 1981-1982. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**: 1-8.
- Georghiou, G. P. 1990. Overview of insecticide resistance. *Managing Resistance to Agrochemicals*. H. M. Le Baronet W. K. Moberg, ACS symposium series: 18-41.
- Gharib, A. H. et Hilsenhoff, W. L. 1988. Efficacy Of 2 Formulations Of *Bacillus-Thuringiensis* Var *Israelensis* (H-14) Against *Aedes-Vexans* And Safety To Non-Target Macroinvertebrates. *Journal of the American Mosquito Control Association* **4**(3): 252-255.
- Gharib, A. H., Wyman, J. A. et Shihata, Z. A. 1989. Laboratory Evaluation Of 3 Mosquito Pathogenic Strains Of *Bacillus-Sphaericus* Isolated In Egypt. *Journal of Invertebrate Pathology* **54**(1): 57-62.
- Gilles, H. et Warrell, D. 1993. Bruce-Chwatt's Essential Mamariology.

- Gilot, B., Pautou, G., Moncada, E., Lachet, B. et Christin, J. G. 1979. La cartographie écologique des populations de tiques exophiles par le biais de la végétation: Bases écologiques, intérêts épidémiologiques. *Document de Cartographie Ecologique, Université Scientifique, technologique et Médicale de Grenoble* **22**: 65-80.
- Grant, D. F., Bender, D. M. et Hammock, B. D. 2001. Esterase and glutathione-S-transferase in *Culex tarsalis*. 67-69.
- Gratz, N. G. 1999. Emerging and resurging vector-borne diseases. *Annual Review of Entomology* **44**: 51-75.
- Guillet, P. 2001. La colonisation de la zone tempérée par des insectes habituellement confinés aux zones tropicales ou subtropicales peut-elle être envisagée et quels en sont les risques? *Changement Climatique: Fantôme ou Réalité?* Montpellier, France., 4ème assemblée générale EDEN: 46-49.
- Gunning, R. V., Dang, H. T., Kemp, F. C., Nicholson, I. C. et Moores, G. D. 2005. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied And Environmental Microbiology* **71**(5): 2558-2563.
- Harrison, T. L., Zangerl, A. R., Schuler, M. A. et Berenbaum, M. R. 2001. Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a hostplant allelochemical. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **48**(4): 179-189.
- Hatzios, K. K. 1989. Developpement of herbicide safeners: industrial and university perspectives. *Crop safeners for herbicides development, uses and mechanisms of action*. K. K. Hatzios et R. E. Hogland. San Diego London Tokyo, Academic Press Inc: 3-46.
- Hayes, J. D. et Wolf, C. R. 1990. Molecular Mechanisms Of Drug-Resistance. *Biochemical Journal* **272**(2): 281-295.
- Hemingway, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**(11): 1009-1015.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L. et Ranson, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**(7): 653-665.
- Hemingway, J., Miyamoto, J. et Herath, P. R. J. 1991. A Possible Novel Link Between Organophosphorus And Ddt Insecticide Resistance Genes In *Anopheles* - Supporting Evidence From Fenitrothion Metabolism Studies. *Pesticide Biochemistry and physiology* **39**(1): 49-56.
- Hoffman, O. L. 1962. Chemical seed treatments as herbicide antidotes. *Weeds* **10**: 322-323.
- Hoffman, O. L. 1978. Herbicides antidotes: from concept to practice. *Chemistry and Action of Herbicides Antidotes*. F. M. Palloset J. E. Casida. New York, Academic Press: 1-13.

- Horowitz, A. R. et Denholm, I. 2000. Impact of insecticide resistance mechanisms on management strategies. *Biochemical sites of insecticide action and resistance*. I. Ishaaya. Berlin, Springer: 323-338.
- Hummel, H. 2003. Introduction of *Diabrotica virgifera virgifera* into the Old World and its consequences: a recently acquired invasive alien pest species on *Zea mays* from North America. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **68**: 45-57.
- Hung, C. F., Prapaipong, H., Berenbaum, M. et Schuler, M. A. 1995. Differential induction of cytochrome P450 transcripts in *Papilio polyxenes* by linear and angular furanocoumarins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**(1): 89-99.
- Ishaaya, I., Ed. 2001. Biochemical sites of insecticide action and resistance. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.
- Jimenez, L. V., Kang, B., deBruyn, B., Lovin, D. D. et Severson, D. W. 2004. Characterization of an *Aedes aegypti* bacterial artificial chromosome (BAC) library and chromosomal assignment of BAC clones for physical mapping quantitative trait loci that influence Plasmodium susceptibility. *Insect Molecular Biology* **13**(1): 37-44.
- Jin-Clark, Y., Lydy, M. J. et Zhu, K. Y. 2002. Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(3): 598-603.
- Kasai, S. et Scott, J. G. 2000. Overexpression of cytochrome P450CYP6D1 is associated with monooxygenase-mediated pyrethroid resistance in house flies from Georgia. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **68**(1): 34-41.
- Kreuz, K., R., T. et Martinoia, E. 1996. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiology* **111**: 349-353.
- Lee, S. S. T. et Scott, J. G. 1989. Microsomal Cytochrome P450 monooxygenases in the house fly (*Musca domestica* L.): biochemical changes associated with pyrethroid resistance and phenobarbital induction. *Pesticide Biochemistry and physiology* **35**: 1-10.
- Li, X. C., Schuler, M. A. et Berenbaum, M. R. 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature* **419**(6908): 712-715.
- Liu, N. et Scott, J. G. 1997. Phenobarbital induction of CYP6D1 is due to a trans acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. *Insect Molecular Biology* **6**(1): 77-81.
- Loevinsohn, M. E. 1994. Climatic Warming And Increased Malaria Incidence In Rwanda. *Lancet* **343**(8899): 714-718.
- Londono, D. K., Siegfried, B. D. et Lydy, M. J. 2004. Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere* **56**(7): 701-706.
- Lounibos, L. P. et Conn, J. E. 2000. Malaria vector heterogeneity in south America. *American Entomologist* **46**(4): 238-249.

- Maire, A. 1971. Incidences des opérations de démoustication sur les biotopes larvaires à *Aedes* dans la région Rhône-Alpes. Grenoble. Grenoble, Grenoble UJF.
- Marquardt, W. C., Black, W. C., Higgs, S., Freier, J. E., Hagedorn, H. H., Kondratieff, B., Hemingway, J. et Moore, C. G. 2005. *Biology of Disease Vectors*. Second Edition, Elsevier Academic Press.
- Martens, P., Kovats, R. S., Nijhof, S., de Vries, P., Livermore, M. T. J., Bradley, D. J., Cox, J. et McMichael, A. J. 1999. Climate change and future populations at risk of malaria. *Global Environmental Change-Human And Policy Dimensions* **9**: S89-S107.
- Maugh, T. 1978a. Pollution - Chemical Companies Effort To Sue Its Accuser Fails. *Science* **199**(4325): 157-160.
- Maugh, T. H. 1978b. Chemicals - How Many Are There. *Science* **199**(4325): 162-162.
- McDonnell, C. M., Brown, R. P., Berenbaum, M. R. et Schuler, M. A. 2004. Conserved regulatory elements in the promoters of two allelochemical-inducible cytochrome P450 genes differentially regulate transcription. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**(10): 1129-1139.
- McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological. Insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**: 193-195.
- McKenzie, J. A. et Batterham, P. 1994. The Genetic, Molecular And Phenotypic Consequences Of Selection For Insecticide Resistance. *Trends In Ecology & Evolution* **9**(5): 166-169.
- McMichael, A., Haines, A., Sloof, R. et Kovats, S. 1996. Climate change and human health. *Geneva: World Health Organisation (WHO)*.
- Meyran, J. C., David, J. P., Cuany, A., Bride, J. M. et Amichot, M. 2002. The biochemical basis of dietary polyphenols detoxification by aquatic detritivorous *Arthropoda*.
- Milam, C. D., Farris, J. L. et Wilhide, J. D. 2000. Evaluating mosquito control pesticides for effect on target and nontarget organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**(3): 324-328.
- Mizuno, D., Takahashi, Y., Hiroi, T., Imaoka, S., Kamataki, T. et Funae, Y. 2003. A novel transcriptional element which regulates expression of the CYP2D4 gene by Oct-1 and YY-1 binding. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure And Expression* **1627**(2-3): 121-128.
- Mouches, C., Pasteur, N., Berge, J. B., Hyrien, O., Raymond, M., Desaintvincent, B. R., Desilvestri, M. et Georghiou, G. P. 1986. Amplification Of An Esterase Gene Is Responsible For Insecticide Resistance In A California Culex Mosquito. *Science* **233**(4765): 778-780.
- Mouches, C., Pauplin, Y., Agarwal, M., Lemieux, L., Herzog, M., Abadon, M., Beyssatarnauty, V., Hyrien, O., Desaintvincent, B. R., Georghiou, G. P. et Pasteur, N. 1990. Characterization Of Amplification Core And Esterase-B1 Gene Responsible

- For Insecticide Resistance In *Culex*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **87**(7): 2574-2578.
- Mougin, C., Polge, N., Scalla, R. et Cabanne, F. 1991. Interactions Of Various Agrochemicals With Cytochrome-P-450-Dependent Monooxygenases Of Wheat Cells. *Pesticide Biochemistry and physiology* **40**(1): 1-11.
- Mullin, C. A. et Scott, J. G. 1992. Biomolecular Basis for Insecticide Resistance: Classification and Comparisons. *Molecular Mechanism of Insecticide Resistance*: 1-13.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. et Nebert, D. W. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**(1): 1-42.
- Nikou, D., Ranson, H. et Hemingway, J. 2003. An adult-specific CYP6P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* **318**: 91-102.
- OILB 1977. Vers la production intégrée par la lutte intégrée. I. w. B. B. O. srop: 163.
- Oliveira, M. F., Silvati, J. R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Lins, U., Braga, C. M. S., Masuda, H. et Oliveira, P. L. 1999. Haem detoxification by an insect. *Nature* **400**: 517-517.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. et Goldman, A. 1992. The Alpha/Beta-Hydrolase Fold. *Protein Engineering* **5**(3): 197-211.
- Pascal, M. et Chapuis, J. L. 2000. Eradication of mammals introduced to islands - Preliminary questions and application. *Revue D Ecologie-La Terre Et La Vie*: 85-104.
- Pates, H. et Curtis, C. 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annual Review Of Entomology* **50**: 53-70.
- Pautou, G. et Girel, J. 2000. The foodplain forest of the French Upper Rhône River Valley., Brill Academic Publishers, Netherlands.
- Pautou, G., Girel, J., Pautou, M. P. et Gruffaz, R. 1995. Hydrologie, paludisme et démoustication. L'exemple de la région Rhône-Alpes. *Revue de Géographie Alpine* **1**: 33-52.
- Petersen, R. A., Zangerl, A. R., Berenbaum, M. R. et Schuler, M. A. 2001. Expression of CYP6B1 and CYP6B3 cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**(6-7): 679-690.
- Ranasinghe, C. et Hobbs, A. A. 1999. Induction of cytochrome P450CYP6B7 and cytochrome b(5) mRNAs from *Helicoverpa armigera* (Hubner) by pyrethroid insecticides in organ culture. *Insect Molecular Biology* **8**(4): 443-447.

- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H. et Feyereisen, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* **298**: 179-181.
- Raymond, M., Chevillon, C., Guillemaud, T., Lenormand, T. et Pasteur, N. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences* **353**: 1-5.
- Raymond, M., Fournier, D., Bride, J. M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M. et Pasteur, N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: Insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* **79**: 1452-1458.
- Raymond, M. et Mouches, C. 1986. Mosquito Resistance To Pesticides. *Recherche* **17**(183): 1561-1562.
- Regnault-Roger, C. 2005. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Londres-Paris-New York, Lavoisier.
- Reiter, P. 2001. Climate change and mosquito-borne disease. *Environmental Health Perspectives* **109**: 141-161.
- Rey, D. 2000. Un exemple de coévolution plante-arthropode: Etude de la phytotoxicité des composés phénoliques de la litière d'*Alnus glutinosa* (Bétulacées) et perspectives d'application en démoustication. Grenoble, Thèse, Université Joseph Fourier, Grenoble I: 72.
- Rey, D., Cuany, A., Pautou, M. P. et Meyran, J. C. 1999. Differential sensitivity of mosquito taxa to vegetable tannins. *Journal of Chemical Ecology* **25**(3): 537-548.
- Rey, D., David, J. P., Besnard, G., Jullien, J. L., Lagneau, C. et Meyran, J. C. 2001. Comparative sensitivity of larval mosquitoes to vegetable polyphenols versus conventional insecticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **98**(3): 361-367.
- Rey, D., David, J. P., Martins, D., Pautou, M. P., Long, A., Marigo, G. et Meyran, J. C. 2000. Role of vegetable tannins in habitat selection among mosquito communities from the Alpine hydrosystems. *Comptes-Rendus de l' Académie des Sciences de Paris, Série III -Sciences de la Vie- Life Sciences* **323**(4): 391-398.
- Robertson, J. L., Preisler, H. K., Ng, S. S., Hickie, L. A. et Gelernter, W. D. 1995. Natural Variation - A Complicating Factor In Bioassays With Chemical And Microbial Pesticides. *Journal of Economic Entomology* **88**(1): 1-10.
- Robertson, S. E., Hull, B. P., Tomori, O., Bele, O., LeDuc, J. W. et Esteves, K. 1996. Yellow fever: a decade of reemergence. *Journal of the American Medical Association* **276**: 1157-1162.
- Roush, R. T. et McKenzie, J. A. 1987. Ecological Genetics Of Insecticide And Acaricide Resistance. *Annual Review Of Entomology* **32**: 361-380.

- Saleh, M. S., El-Meniawi, F. A., Kelada, N. L. et Zahran, H. M. 2003. Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal Of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* **127**(1): 29-32.
- Sawicki, R., Singh, S. P., Mondal, A. K., Benes, H. et Zimniak, P. 2003. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. *Biochemical Journal* **370**: 661-669.
- Schaffner, F. 1999. Biodiversity and dynamics of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in France. *Annales de la Société Entomologique de France* **35 Suppl. S**: 319-327.
- Scharf, M. E., Parimi, S., Meinke, L. J., Chandler, L. D. et Siegfried, B. D. 2001. Expression and induction of three family 4 cytochrome P450 (CYP4)* genes identified from insecticide-resistant and susceptible western corn rootworms, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Molecular Biology* **10**(2): 139-146.
- Scott, G., Liu, N. et Wen, Z. 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology*(Part C 121): 147-155.
- Scott, J. G. 1989. Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid-resistant house flies. *Pesticide Biochemistry and physiology* **34**: 27-31.
- Scott, J. G. 1996. Inhibitors of CYP6D1 in house fly microsomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**(7): 645-649.
- Scott, J. G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**(9): 757-777.
- Shen, Z., Wells, R. L., Liu, J. et Elkind, M. M. 1993. Identification of a cytochrome P450 gene by reverse transcription-PCR using degenerate primers containing inosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 11483-11487.
- Sinègre, G., Gabinaud, A., Quermel, J.-M. et Vigo, G. 1967. Présence d'*Aedes (Ochlerotatus) rusticus* Rossi 1870 dans le Sud de la France. *Annales de Parasitologie humaine et comparée* **XLII**(6).
- Snyder, M. J. et Glendinning, J. I. 1996. Causal connection between detoxification enzyme activity and consumption of a toxic plant compound. *Journal of Comparative Physiology A* **179**: 255-261.
- Snyder, M. J., Hsu, E. L. et Feyereisen, R. 1993. Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *manduca sexta*. *Journal of Chemical Ecology* **19**: 2903-2916.
- Southwick, L. W., Willis, G. H., Bengston, R. L. et Lormand, T. J. 1990. Effect of subsurface drainage on runoff losses of atrazine and metolachlor in Southern Louisiana. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **45**(1): 113-119.

- Stevens, J. L., Snyder, M. J., Koener, J. F. et Feyereisen, R. 2000. Inducible P450s of the CYP9 family from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**(7): 559-568.
- Suwanchaichinda, C. et Brattsten, L. B. 2001. Effects of exposure to pesticides on carbaryl toxicity and cytochrome P450 activities in *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **70**(2): 63-73.
- Suwanchaichinda, C. et Brattsten, L. B. 2002. Induction of microsomal cytochrome P450s by tire-leachate compounds, habitat components of *Aedes albopictus* mosquito larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **49**(2): 71-79.
- Tabashnik, B. E. 1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(8): 3488-3490.
- Terriere, L. C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Annual Reviews Inc. All rights reserved* **29**: 71-88.
- Tilquin, M. 2003. Caractérisation des composés larvicides dans les litières arborescentes des gîtes à moustiques pré-alpins en vue de leur utilisation en démoustication. Grenoble, Université Joseph Fourier: 76.
- Tilquin, M., Meyran, J. C., Asther, M. et Marigo, G. 2002a. Hot extraction and characterization of a lignin fraction involved in the larvicidal effects of vegetable leaf litter against mosquito. *Journal of Chemical Ecology* **28**(8): 1497-1510.
- Tilquin, M., Meyran, J. C. et Marigo, G. 2002b. Dietary toxicity of decomposed arborescent leaf litter against larval mosquito: Involvement of a lignin-polypeptidic complex. *Journal of Agricultural and food Chemistry* **50**(22): 6378-6382.
- Tilquin, M., Meyran, J. C. et Marigo, G. 2004. Comparative capability to detoxify vegetable allelochemicals by larval mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology* **30**(7): 1381-1391.
- Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D. et Van Mellaert, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **247**: 72-74.
- Vaughan, A. et Hemingway, J. 1995. Mosquito Carboxylesterase Est-Alpha-2(1)(A(2)) - Cloning And Sequence Of The Full-Length Cdna For A Major Insecticide Resistance Gene Worldwide In The Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Biological Chemistry* **270**(28): 17044-17049.
- Vontas, J. G., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, M. J., Ayoutanti, A. et Hemingway, J. 2001. Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **71**(2): 124-132.
- Walker, C. H. et Mackness, M. I. 1983. Esterases: problems of identification and classification. *Biochemical Pharmacology* **32**(22): 3265-3269.

- Watson, R., Zinyowera, M. et Moss, R. 1996. Impacts, Adaptations and Mitigation of Climate Change: Scientific-Technical Analyses. Contribution of Working Group II to the Second Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).
- Wheeler, G. S., Slansky, F., Jr. et Yu, S. J. 1993. Fall armyworm sensitivity to flavone: Limited role of constitutive and induced detoxifying enzyme activity. *Journal of Chemical Ecology* **19**: 645-667.
- Willott, E. 2004. Restoring nature, without mosquitoes? *Restoration Ecology* **12**(2): 147-153.
- Yu, J., Vasanthan, T. et Temelli, F. 2001. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and food Chemistry* **49**(9): 4352-4358.
- Yu, S. J. 1982. Host plant induction of glutathione-S-transferase in the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and physiology* **18**: 101-106.
- Yu, S. J. 1984. Interactions of allelochemicals with detoxification enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworms. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**: 60-68.
- Yu, S. J. 1986. Consequences of induction of foreign compound-metabolizing enzymes in insects. *Molecular aspects of insect-plant associations*. L. B. Brattsten et S. Ahmed, Plenum Publishing corporation: 153-174.
- Yu, S. J. 1999. Induction of new glutathione S-transferase isozymes by allelochemicals in the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **63**: 163-171.
- Yu, S. J. 2002. Biochemical characteristics of microsomal and cytosolic glutathione S-transferases in larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and physiology* **72**: 100-110.
- Yu, S. J. 2004. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and physiology* **80**: 113-122.
- Yu, S. J. et Terriere, L. C. 1979. Cytochrome P-450 in insects. 1. Differences in the forms present in insecticide resistant and susceptible house flies. *Pesticide Biochemistry and physiology* **12**: 239-248.
- Zhang, H., Yang, C., Huang, J. et Lü, L. 2004. Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biocontrol Science and Technology* **14**(3): 321-325.